

CLINEU JULIEN SEKI UEHARA

**CARACTERIZAÇÃO DOS GENES OR2I1P, OR12D3, OR14J1, OR2B4P,
OR2E1P, OR1F12, OR2B8P, OR2B7P, OR2W2P, OR2W4P, OR2B6 E
OR2W6P EM LINHAGENS CELULARES HUMANAS**

CURITIBA

2008

CLINEU JULIEN SEKI UEHARA

**CARACTERIZAÇÃO DOS GENES OR2I1P, OR12D3, OR14J1, OR2B4P,
OR2E1P, OR1F12, OR2B8P, OR2B7P, OR2W2P, OR2W4P, OR2B6 E
OR2W6P EM LINHAGENS CELULARES HUMANAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de concentração de Genética, do Programa de Pós-Graduação em Genética, do Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria da Graça Bicalho.

CURITIBA

2008

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Uehara, Clineu Julien Seki

Caracterização dos genes OR2I1P, OR12D3, OR14J1, OR2B4P, OR2E1P, OR1F12, OR2B8P, OR2B7P, OR2W2P, OR2W4P, OR2B6 e OR2W6P em linhagens celulares humanas. / Clineu Julien Seki Uehara. – Curitiba, 2008. xi, 68f. : il ; 30cm.

Orientadora: Maria da Graça Bicalho

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética 2. Linhagem (Genética). I.Título II. Bicalho, Maria da Graça III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD(20.ed.) 575.1

PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de dissertação de Mestrado, a que se submeteu **CLINEU JULIEN SEKI UEHARA** para fins de adquirir o título de Mestre em Ciências Biológicas na Área de Genética da Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 15 de agosto de 2008

Banca Examinadora

e/OBico/PR

Professora Doutora Maria da Graça Bicalho
Orientadora e Presidente

Adriana F. Mercadante

Professora Doutora Adriana Frohlich Mercadante
Membro

Valéria Sperandio Roxo

Professora Doutora Valéria Sperandio Roxo
Membro

Visto:

Maria Luiza Petzl-Erler

Prof.^a Dr.^a Maria Luiza Petzl-Erler
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética

AGRADECIMENTOS

Todo trabalho faz parte do empenho de várias pessoas, nunca é o esforço de um e sim o poder do coletivo. Por isso, o reconhecimento dos colegas dessa jornada fica aqui registrado! Sem a participação dessas pessoas, esse trabalho não seria realizado!

À minha orientadora, professora Dr^a. Maria da Graça Bicalho, por toda a confiança, por toda a motivação e entusiasmo depositado nesta jornada.

Aos professores do Departamento de Genética da UFPR, por passar um pouco do seu conhecimento para que esta obra pudesse ser concretizada.

Aos membros da bancada de acompanhamento professora Dr^a. Valéria Sperandio Roxo e professor Dr^o. João Carlos Marques Magalhães, pelas sugestões e disposição em ajudar. A professora Dr^a. Adriana Frohlich Mercadante, por sua participação na banca de avaliação, contribuindo com suas sugestões.

Ao pessoal do *Institut für Immunogenetik, Charité* da Universidade Livre de Berlim, principalmente ao Pablo Sandro Carvalho Santos e aos pesquisadores Andreas Ziegler e Barbara Uchanska-Ziegler, pelo suporte científico e por ter fornecido gentilmente as linhagens celulares utilizadas neste estudo.

Ao pessoal do IBMP, principalmente ao Stênio Perdigão Fragoso, a Adriana Castilhos Souza Umaki e ao Paulo Rodrigo Claure Arauco, pela ajuda nas técnicas de clonagens.

Aos meus companheiros no LIGH, Dr^a. Eni Picchioni Bompeixe, Dr^a. Fabiana Poerner, Msc. Fernanda Ribas Zacarias, José Luiz Marques Bilá Jr., Cláudia Terezinha Schuertz, Marina Bárbara de Sousa Xavier, Gorete Ynaquiev Tomaz de Rezende, Téo M. Ruiz, Paulo Rincoski Costantino, Msc. Alessandro Pirri, Rafael Gustavo Vargas e Isabel Terezinha da Costa Moreira Martinez, por todo o apoio e compreensão, com todas as suas idéias e sugestões. Gostaria de agradecer especialmente: a Sibelle Botogosque Mattar, pela contribuição na etapa

do seqüenciamento das amostras; e a Sonia Maria Correia Machado da Costa, por me ensinar as técnicas dentro laboratório.

Aos meus pais e professores, Clineu Uehara e Mitica Seki Uehara, pelo suporte e por me ensinar a importância da dedicação e o amor pelo ensino.

À minha família, minha irmã Letícia, tia Odete, tio Luís, tia Lúcia e tia Celina que sempre me apoiaram e incentivaram.

Aos amigos de infância, Luciano e Francis, e aos amigos da graduação, Leonardo, Chico e Francini! Obrigado pelas palavras de incentivo e os momentos de alegria!

Enfim, ao que torna tudo possível: Deus!

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	01
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1.	CROMOSSOMO 6, MHC CLÁSSICO E O MHC ESTENDIDO (MHCx).....	03
2.1.1.	MHC Clássico.....	03
2.1.1.1.	Localização cromossômica e estrutura gênica da região MHC.....	05
2.1.1.2.	Olfato e MHC.....	10
2.1.2.	MHC Estendido (MHCx).....	15
2.1.2.1.	Genes de receptores olfatórios ligados ao MHC.....	19
2.2.	RECEPTORES OLFATÓRIOS.....	21
2.2.1.	Distribuição Cromossômica dos Genes de Receptores Olfatórios no Genoma Humano.....	23
2.2.2.	Produto protéico dos receptores olfatórios.....	23
2.2.3.	Nomenclatura dos Genes <i>OR</i> em humanos.....	26
2.2.4.	Transdução de Sinal Mediada pelos Receptores Olfatórios.....	27
2.2.5.	Sistemas Quimiossensoriais e Receptores Olfatórios.....	27
3.	OBJETIVOS GERAIS.....	33
3.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4.	JUSTIFICATIVA.....	34
5.	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
5.1.	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	35

5.2.	CULTIVO CELULAR E EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO....	37
5.3.	QUANTIFICAÇÃO DO DNA OBTIDO NA ETAPA DA EXTRAÇÃO.....	37
5.4.	SEQUENCIAMENTO DOS GENES DOS RECEPTORES OLFATÓRIOS.....	37
5.4.1.	Desenvolvimento dos Oligonucleotídeos Iniciadores para os Genes <i>OR</i>	39
5.4.2.	Reação de Amplificação dos Genes <i>OR</i> (<i>OR2I1P</i> , <i>OR12D3</i> , <i>OR14J1</i> , <i>OR2B4P</i> , <i>OR2E1P</i> , <i>ORF1F12</i> , <i>OR2B8P</i> , <i>OR2B7P</i> , <i>OR2W2P</i> , <i>OR2W4P</i> , <i>OR2B6</i> , <i>OR2W6P</i>).....	40
5.4.3.	Purificação das Amostras de Genes <i>OR</i> Amplificados.....	41
5.4.4.	Seqüenciamento, Precipitação e Denaturação das Amostras de Genes <i>OR</i> Amplificados.....	42
5.5.	CARACTERIZAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DOS GENES DE RECEPTORES OLFATÓRIOS LIGADOS AO MHC.....	43
6.	RESULTADOS	44
6.1.	RESULTADOS DO PROCESSO DE IMPLANTAÇÃO E AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO DE GENES <i>OR</i>	44
6.2.	POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNP).....	45
6.3.	COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DO PRESENTE ESTUDO COM OS DE EHLERS <i>et al.</i> (2000).....	57
7.	DISCUSSÃO	58
8.	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS	61

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	VIAS SIMPLIFICADAS DE PROCESSAMENTO DE ANTÍGENOS PARA APRESENTAÇÃO POR MOLÉCULAS HLA.....	05
FIGURA 2 -	ORGANIZAÇÃO CROMOSSÔMICA E GÊNICA DO MHC.....	06
FIGURA 3 -	REPRESENTAÇÕES DAS MOLÉCULAS HLA DE CLASSE I E DE CLASSE II.....	08
FIGURA 4 -	POLIALELISMO RELACIONADO AS PROTEÍNAS E ALELOS <i>HLA</i> DE CLASSE I E II.....	09
FIGURA 5 -	MECANISMOS DE COMO O MHC ATUARIA NA FORMAÇÃO DO “ODORTIPO”.....	14
FIGURA 6 -	MAPA GÊNICO DO MHC ESTENDIDO.....	18
FIGURA 7 -	OS GENES DE RECEPTORES OLFATÓRIOS LIGADOS AO MHC.....	19
FIGURA 8 -	DIAGRAMA REPRESENTATIVO DOS GENES DE RECEPTORES OLFATÓRIOS LIGADOS AO MHC.....	20
FIGURA 9 -	EXEMPLO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA DOS RECEPTORES OLFATÓRIOS.....	24
FIGURA 10 -	LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE GENES <i>OR</i> HUMANOS.....	25
FIGURA 11 -	TRANSDUÇÃO DE SINAL MEDIADA PELOS RECEPTORES OLFATÓRIOS.....	27
FIGURA 12 -	SISTEMAS QUIMIOSSENSORIAIS ASSOCIADOS AO SENTIDO DO OLFATO.....	28
FIGURA 13 -	EXEMPLO DE COMO SÃO FORMADOS OS CÓDIGOS PARA ODORANTES ATRAVÉS DA COMBINAÇÃO DOS RECEPTORES OLFATÓRIOS.....	31

FIGURA 14 - GENES <i>OR</i> LIGADOS AO MHC ANALISADOS NESTE ESTUDO.....	38
FIGURA 15 - EXEMPLO DE INTERPRETAÇÃO DOS ALINHAMENTOS.....	46
FIGURA 16 - EXEMPLOS DE <i>SLIPPAGE</i> DA DNA POLIMERASE....	58
FIGURA 17 - <i>SLIPPAGE</i> DA DNA POLIMERASE OCORRIDO NA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>OR1F12</i>	59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	CARACTERÍSTICAS DAS LINHAGENS CELULARES PESQUISADAS.....	36
TABELA 2 -	RELAÇÃO DOS INICIADORES DESENVOLVIDOS.....	39
TABELA 3 -	REAGENTES UTILIZADOS PARA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO.....	40
TABELA 4 -	CONDIÇÕES DE CICLAGEM UTILIZADAS NA PCR.....	40
TABELA 5 -	REAGENTES UTILIZADOS NA ETAPA DE PURIFICAÇÃO.....	41
TABELA 6 -	CONDIÇÕES DE CICLAGEM UTILIZADAS NA ETAPA DE PURIFICAÇÃO.....	41
TABELA 7 -	REAGENTES UTILIZADOS NA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.....	42
TABELA 8 -	REAGENTES UTILIZADOS NA CALIBRAÇÃO ESPECTRAL.....	42
TABELA 9 -	CONDIÇÕES DE CICLAGEM UTILIZADAS NAS REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO DOS GENES <i>OR211P</i> , <i>OR12D3</i> , <i>OR14J1</i> , <i>OR2B4P</i> , <i>OR2E1P</i> , <i>OR1F12</i> , <i>OR2B8P</i> , <i>OR2B7P</i> , <i>OR2W2P</i> , <i>OR2W6</i>	42
TABELA 10 -	CONDIÇÕES DE CICLAGEM UTILIZADAS NAS REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO DOS GENES <i>OR2W4P</i> e <i>OR2B6</i>	43
TABELA 11 -	NÚMERO DE PARES DE BASES DE GENES <i>OR</i> SEQUENCIADOS.....	44
TABELA 12 -	NÚMERO DE SNPs NOS GENES <i>OR</i> SEQUENCIADOS.....	45

LISTA DE SIGLA E ABREVIATURAS

kDa -	Quilodalton
Mb -	Megabases
µl -	Microlitro
µM -	Micro molar
BTN -	Gene da proteína butirofilina
D.O. -	Densidade óptica
dNTPs -	Desoxinucleotídeos trifosfatos
EXO I -	Enzima exonuclease I
HFE -	Gene da hemocromatose
HLA -	Antígenos Leucocitários Humanos
HORDE -	do inglês: <i>The Human Olfactory Receptor Data Exploratorium</i>
HUGO -	do inglês: <i>The Human Genome Organization</i>
IMGT -	do inglês: <i>The international ImMunoGenetics information system</i>
LT -	Linfotoxina
MHC -	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MHCx -	Complexo Principal de Histocompatibilidade Estendido
MOE -	Epitélio Olfatório Principal
OR -	Receptor Olfatório
RT-PCR -	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
PCR -	Reação em cadeia da polimerase
SAP -	Enzima Fosfatase Alcalina de Camarão
SNP -	Polimorfismo de nucleotídeo único
T CD4 ⁺ -	Linfócito T que expressa a molécula de superfície CD4 ⁺
T CD8 ⁺ -	Linfócito T que expressa a molécula de superfície CD8 ⁺
TAP -	Transportador associado ao processamento de antígenos
TCR -	Receptor de Linfócitos T
TM -	Domínio transmembrana
TNF -	Fator de Necrose Tumoral
tRNA -	RNA transportador
VNO -	Órgão Vomeronasal

RESUMO

A identificação de moléculas presentes no ar proporciona aos seres vivos a capacidade de perceber o ambiente e desenvolver respostas as quais permitam a sobrevivência e a reprodução. São várias as hipóteses que associam preferências olfativas e hábitos comportamentais a moléculas codificadas por genes do MHC. Na espécie humana, características distintas como, por exemplo, o reconhecimento da prole e parentesco, escolha preferencial de parceiros, seleção gamética e hábito tabagista, têm sido freqüentemente associadas a certos haplótipos *HLA*. O presente estudo tem como objetivo principal investigar polimorfismos de nucleotídeo único (*SNPs*) nos genes *OR* (*OR2I1P*, *OR12D3*, *OR14J1*, *OR2B4P*, *OR2E1P*, *OR1F12*, *OR2B8P*, *OR2B7P*, *OR2W2P*, *OR2W4P*, *OR2B6* e *OR2W6P*) de 10 linhagens celulares humanas (BM28.7, BM19.7, LG2, KR3598, H2LCL, WT51, SA, YAR, OLGA e AMAI). A investigação desses *SNPs* foi realizada utilizando-se a técnica de seqüenciamento, compreendendo toda a região que codifica para os domínios transmembrana dos receptores olfatórios. O presente estudo somou-se aos que já foram realizados por EHLERS *et al.*, 2000 (*OR2B2*, *OR2AD1P*, *OR2W1*, *OR2P1P*, *OR2B3*, *OR2J1*, *OR2J3*, *OR2N1P*, *OR2J2*, *OR2J4P*, *OR2H4P*, *OR2G1P*, *OR2U1P*, *OR2U2P*, *OR5V1*, *OR12D2*, *OR12D1P*, *OR11A1*, *OR10C1*, *OR2H1*, *OR2H5P* e *OR2H2*), cujo objetivo foi fornecer dados complementares sobre a seqüência de todo o *cluster* de genes *OR* ligados ao MHC. No presente estudo foram identificados nove (9) *SNPs* ainda não descritos na literatura. Os resultados obtidos, e por nós referenciados como genótipos *OR* de referência, são importantes para entendimento da organização e da estrutura de genes *OR* no contexto do MHCx, além de que, fundamentarão os próximos estudos relacionados aos genes *OR* desenvolvidos pelo grupo de pesquisa LIGH em parceria com *Institut für Immunogenetik, Charité*.

ABSTRACT

The identification of molecules present in the air allows living organisms to recognize the environment and develop proper responses to different situations, a very important aspect for survival and reproduction. There are many hypothesis that associate olfactory preferences and behavior with molecules that are codified by MHC genes. In humans, different features, such as, kin and sibling recognition, preferential partner choice, gametic selection, smoking habit, have been frequently associated to certain HLA haplotypes. The present report aims to investigate single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *OR* genes (*OR2I1P*, *OR12D3*, *OR14J1*, *OR2B4P*, *OR2E1P*, *OR1F12*, *OR2B8P*, *OR2B7P*, *OR2W2P*, *OR2W4P*, *OR2B6* and *OR2W6P*) of 10 human cell lineages (BM28.7, BM19.7, LG2, KR3598, H2LCL, WT51, SA, YAR, OLGA and AMAI). To investigate these SNPs we used the sequencing technique of all seven transmembrane region of the olfactory receptor. This study corroborated a previous investigation of EHLERS *et al.*, 2000 (*OR2B2*, *OR2AD1P*, *OR2W1*, *OR2P1P*, *OR2B3*, *OR2J1*, *OR2J3*, *OR2N1P*, *OR2J2*, *OR2J4P*, *OR2H4P*, *OR2G1P*, *OR2U1P*, *OR2U2P*, *OR5V1*, *OR12D2*, *OR12D1P*, *OR11A1*, *OR10C1*, *OR2H1*, *OR2H5P* and *OR2H2*), which willed to give complementary data about all the cluster of *OR* genes present in the short arm of chromosome 6. In our study we found nine (9) SNPs not described in the current literature. The results obtained, considered as reference *OR* genotype by our workgroup, are very important to understand the organization and structure of *OR* genes in the context of extended MHC. Furthermore, this data will support the next investigations related to *OR* genes developed by the LIGH workgroup in partnership with the *Institut für Immunogenetik, Charité*.

1. INTRODUÇÃO

O prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 2004 foi entregue à dupla de cientistas norte americanos Richard Axel e Linda B. Buck pelas pesquisas sobre receptores olfatórios e a organização do sistema olfatório. Até então, dentre os sentidos humanos, o olfato era o menos estudado e o mecanismo básico que permitia o reconhecimento de cerca de 10.000 diferentes odores ainda permanecia por ser elucidado.

Os estudos conduzidos por BUCK e AXEL (1991) permitiram revelar a existência de uma grande família gênica, formada por aproximadamente 1.000 genes diferentes, que codificam para proteínas que atuam como receptores olfatórios. Esses receptores estão presentes na superfície das células olfativas.

Quando inspiramos, as moléculas dispersas no ar entram em contato com os receptores olfatório presentes nos neurônios sensitivos. As células sensibilizadas disparam impulsos nervosos para micro domínios específicos localizados no bulbo olfatório que vão ser conduzidos para determinadas regiões cerebrais. Posteriormente, o cérebro analisa o padrão de ativação e reconhece determinado odor (MALNIC *et al.*, 1999). Essa capacidade de identificar moléculas presentes no ar, através do ato de “cheirar”, proporciona aos seres vivos a capacidade de perceber o ambiente e desenvolver respostas propícias que permitam a sobrevivência e a reprodução.

No campo da biologia social, um aspecto importante é a comunicação através de moléculas voláteis, percebidas pelo sistema olfatório de indivíduos da mesma espécie, e que atuam de forma a transmitir informações relevantes resultando em mudanças comportamentais (BROWN e MACDONALD, 1985). Por exemplo, YAMAZAKI *et al.* (1990) relataram, em camundongos, uma preferência por parceiros sexuais dependente de haplótipos MHC que aparentemente seria mediada pelo olfato (PEN e Potts, 1999).

Um grande número de genes situados na região MHC é relacionado com a resposta imune. Entretanto, outros locos gênicos sem qualquer relação com a resposta imunológica foram mapeados nessa região através de estudos de ligação (FAN *et al.*,

1995). Um exemplo foi o estudo de BERGEN *et al.* (1999) que realizaram uma varredura no genoma humano em busca de marcadores moleculares para o tabagismo e mapearam marcadores para esse fenótipo no cromossomo 6, próximos da região do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC).

FÜST *et al.* (2004), baseados no estudo anterior, mapearam marcadores MHC de Classe III associados ao hábito de fumar. Nesse estudo encontraram uma alta frequência do haplótipo MHC, caracterizado pela presença de alelos nulos para o gene *C4A* e apenas um gene *C4B* associado ao alelo TNF2 do promotor do gene *TNFA*. Como a região do MHC apresenta como característica, um forte desequilíbrio de ligação com “agrupamentos” (*clusters*) de genes de receptores olfatórios (*genes OR*) na região do MHC estendido (MHCx) é possível que esses genes influenciem na predisposição ao hábito tabagista.

O seqüenciamento dos genes de receptores olfatórios de 10 linhagens celulares humanas, gentilmente cedidas e também analisadas num estudo prévio realizado por EHLERS *et al.* (2000) introduz, otimiza e consolida uma linha de investigação no LIGH relacionada a genes situados no MHCx humano e sua provável influência em características comportamentais. As informações obtidas poderão contribuir para uma maior compreensão dos mecanismos que predisõem ao hábito tabagista, bem como a escolha preferencial de parceiros, características que têm sido associadas com genes da região MHC.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CROMOSSOMO 6, MHC CLÁSSICO E O MHC ESTENDIDO (MHCx)

O cromossomo 6 humano, é um cromossomo metacêntrico, e constitui aproximadamente 6% do genoma humano. O seqüenciamento completo desse cromossomo pelo Projeto Genoma revelou que o mesmo é constituído por 166.880.988 pares de base (MUNGALL *et al.*, 2003).

Em sua composição, o cromossomo 6 apresenta um grande número de genes, sendo a região do MHC, provavelmente, a mais seqüenciada do genoma humano (LECHLER e WARRENS, 2000). Os genes da região MHC desempenham papel fundamental na resposta imunológica.

Além dos genes relacionados a resposta imune, o cromossomo 6 também apresenta muitos genes que codificam receptores envolvidos na percepção sensorial e/ou em certas características comportamentais (ZIEGLER, 1997).

2.1.1. MHC Clássico

O MHC humano (do inglês: Major Histocompatibility Complex) é denominado HLA (Antígenos Leucocitários Humanos) e, foi caracterizado através da busca por diferenças genéticas determinadas sorologicamente, que pudessem ser utilizadas para parear indivíduos para fins de transplantes de órgãos e tecidos. Entretanto, a função primária das proteínas HLA é constituir a base molecular para que linfócitos T possam discriminar o próprio do não próprio (HORTON *et al.*, 2004).

As moléculas HLA clássicas de classe I são expressas por todos os tipos celulares nucleados e plaquetas, e sua função é apresentar peptídeos antigênicos provenientes de patógenos endógenos (como vírus) ou de células tumorais, às células T CD8⁺. Como observado sucintamente na Figura 1, proteínas presentes no citosol são degradadas por uma estrutura conhecida como proteassomo. Os peptídeos oriundos do

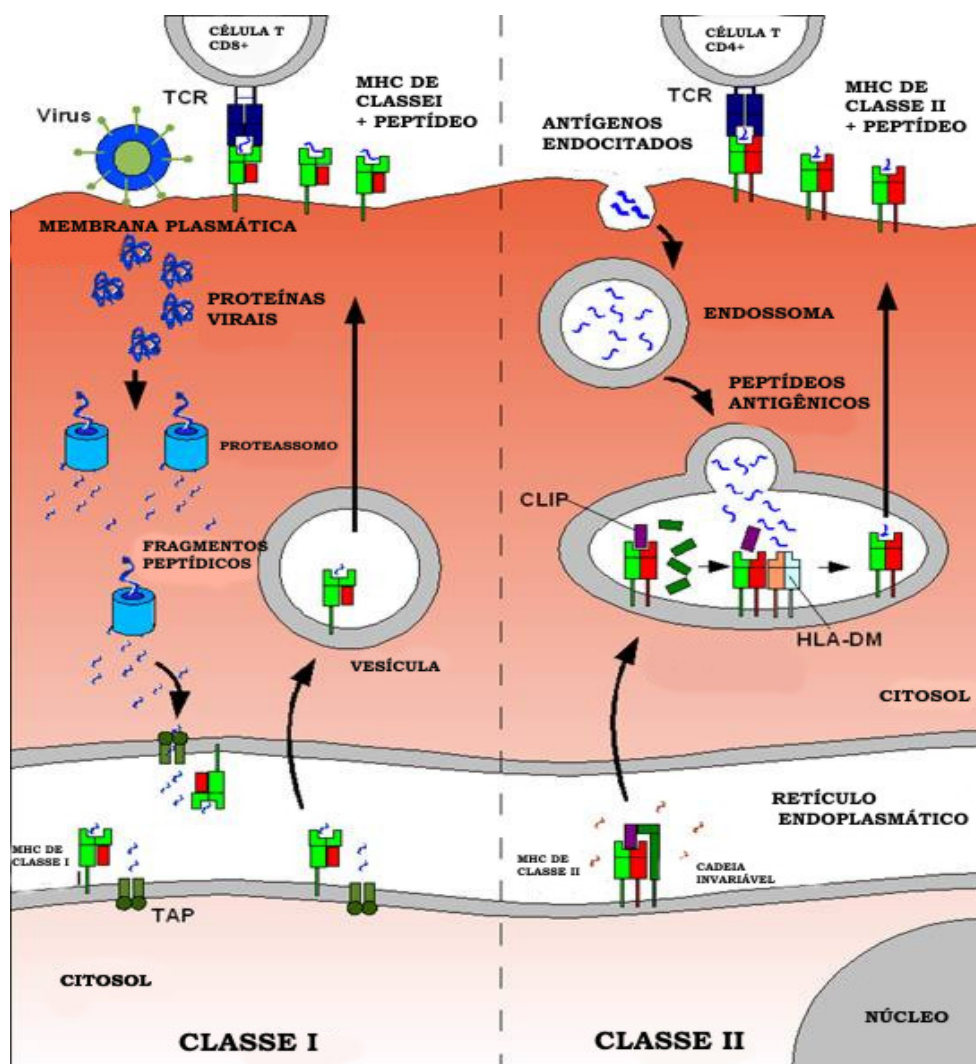
processamento pelo proteassomo são transportados para o interior do retículo endoplasmático pelas proteínas TAP (Transportador Associado ao Processamento de antígeno). No retículo endoplasmático, ocorre a formação do complexo peptídeo-MHC, que posteriormente é expresso na superfície celular (KLEIN e SATO, 2000a).

Os linfócitos T possuem receptores de membrana (TCR) que reconhecem o complexo peptídeo-MHC. O reconhecimento também envolve outros fatores co-estimuladores que desencadeiam a produção de citocinas que orquestram a resposta imunológica. É importante salientar que no caso da resposta celular, os linfócitos T envolvidos apresentam uma proteína de membrana denominada CD8 que permite a interação com a molécula HLA de classe I. Caso ocorra ativação desse tipo celular (TCD8^+), a célula que apresentou o peptídeo antigênico será destruída e a resposta imune do tipo celular será ativada (KLEIN e SATO, 2000a).

Contudo, quando existe a presença de patógenos extracelulares, a resposta imunológica se inicia pela apresentação de peptídeos antigênicos por moléculas HLA de classe II (também representada na Figura 1). Através da endocitose, proteínas próprias ou patógenos extracelulares são processadas no interior celular. O processamento ocorre nos lisossomos que contêm enzimas que degradam seu conteúdo em peptídeos. Esses peptídeos então são incorporados às moléculas MHC de classe II e expressos na superfície celular para apresentação aos linfócitos T CD4^+ . A interação entre a célula que expressa os peptídeos processados e o linfócito T também ocorre através da interação entre o TCR e a molécula HLA (KLEIN e SATO, 2000b).

No entanto, as moléculas HLA de classe II interagem através de seu domínio $\beta 2$ com o antígeno de superfície CD4 encontrado em linfócitos TCD4^+ . Dessa forma, a ativação específica dessa classe de linfócito gera uma resposta imunológica de caráter humoral, ao contrário do processo de reconhecimento via linfócito TCD8^+ . A expressão de moléculas HLA de classe II apresenta uma distribuição restrita a linfócitos B, monócitos e macrófagos. Em algumas situações especiais as células endoteliais de capilares e vênulas também expressam moléculas de classe II (KLEIN e SATO, 2000b).

FIGURA 1 – VIAS SIMPLIFICADAS DE PROCESSAMENTO DE ANTÍGENOS PARA APRESENTAÇÃO POR MOLÉCULAS HLA



FONTE: HALLING-BROWN, M. D. **Computational Techniques for the Prediction of Minor Histocompatibility and T cell Antigens**. Disponível em: <http://igrid-ext.cryst.bbk.ac.uk/WWW/PhD_thesis.htm>. Acesso em: 03 jun. 2008.

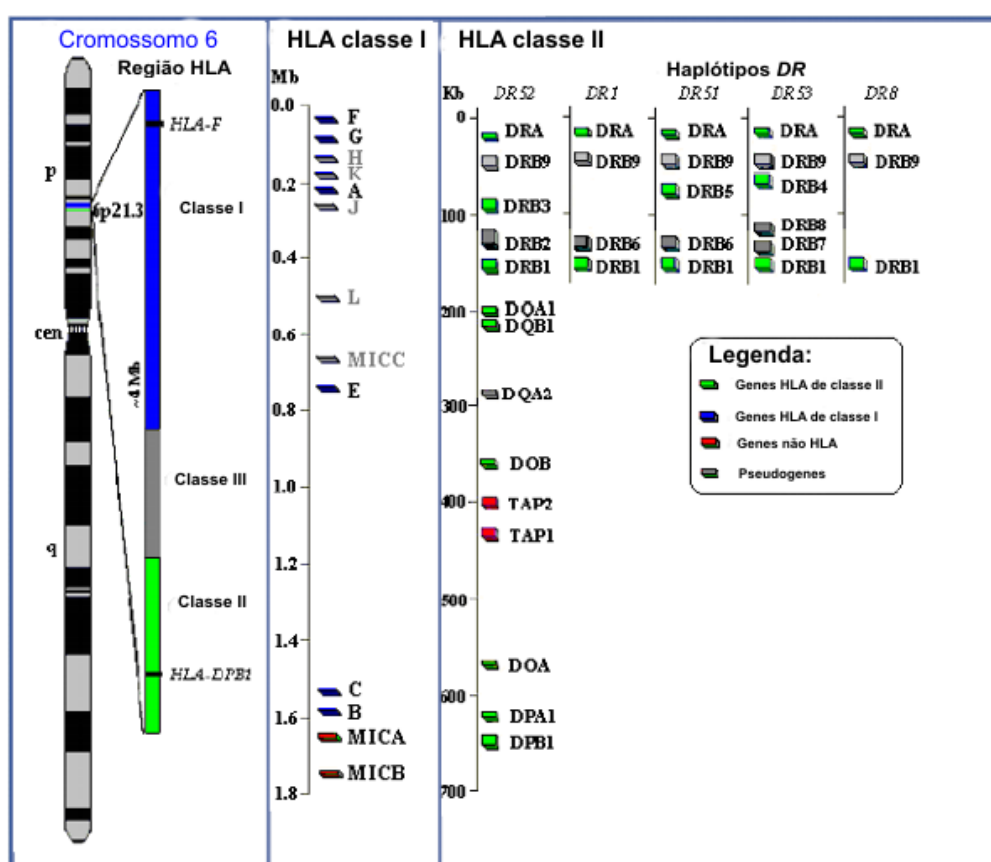
NOTA: A representação demonstra de forma simplificada o processamento e a apresentação de antígenos aos linfócitos T. O lado esquerdo representa o processamento e a apresentação mediada por moléculas MHC de classe I. O lado direito da gravura representa o processamento de polipeptídeos oriundos do meio extracelular e apresentação por moléculas HLA de classe II.

2.1.1.1 Localização cromossômica e estrutura gênica da região MHC

O MHC humano está localizado no braço curto do cromossomo 6, na banda 6p21.3, que possui um comprimento de 3,6 milhões de bases (3,6 Mb), e compreende

aproximadamente 240 locos (SHIINA, INOKO e KULSKI, 2004), sendo que 40 deles foram relacionados a alguma função imunológica pela revisão de KLEIN e SATO (2000a). O complexo MHC possui vários genes *HLA* e outros genes não pertencentes ao sistema HLA. A divisão desse complexo em 3 regiões (Figura 2) é baseada na estrutura e função gênica dos produtos moleculares codificados pelos genes correspondentes.

FIGURA 2 – ORGANIZAÇÃO CROMOSSÔMICA E GÊNICA DO MHC



FONTE: NCBI. **dbMHC HOME**. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gv/mhc/main.cgi?cmd=init&user_id=0&probe_id=0&source_id=0&locus_id=0&locus_group=1&proto_id=0&kit_id=0&graphview=0 > Acesso em: 03 jun. 2008.

- Genes HLA da região MHC de classe I.

A região de classe I é composta por mais de 122 locos: clássicos, não-clássicos e por pseudogenes. Os locos denominados não clássicos são *HLA-E*, *HLA-F* e *HLA-G*, sendo pouco polimórficos. Os locos considerados pseudogenes são *HLA-H*, *HLA-J*, *HLA-K* e *HLA-L* (CAMPBELL e TROWSDALE, 1993).

Os genes clássicos (*HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*) são os mais conhecidos. Esses genes *HLA* são altamente polimórficos e codificam para a cadeia α das moléculas HLA de classe I cuja estrutura heterodimérica se completa com uma cadeia leve de β 2-microglobulina, codificada por um gene de mesmo nome localizado no cromossomo 15. Essa estrutura molecular só é funcional com o peptídeo antigênico alojado na fenda da molécula HLA (Figura 3a).

- Genes HLA da região MHC de classe II.

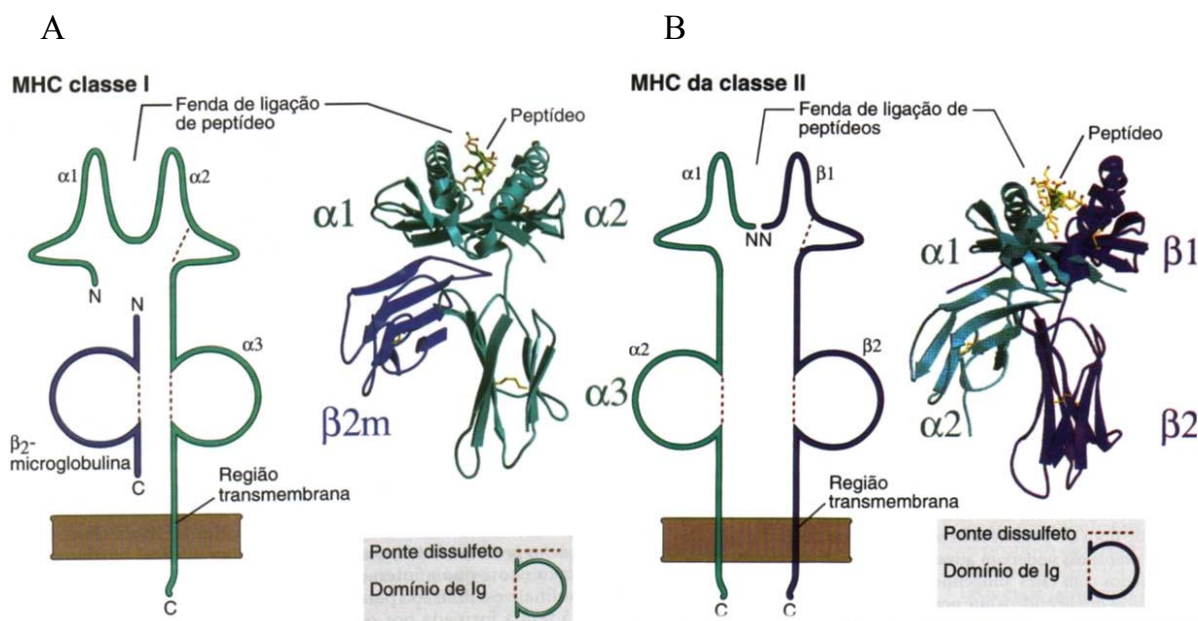
Os genes que codificam as moléculas de classe II estão mapeados na região *HLA-D*, especificamente nas sub-regiões DR, DQ e DP. Os genes situados nessas sub-regiões codificam respectivamente as moléculas HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP. As moléculas de classe II são constituídas de duas cadeias polipeptídicas (α e β) ligadas de forma não covalente (Figura 3b). A cadeia α tem em torno de 32 a 34kDa e a cadeia β tem em torno de 29 a 32kDa e são codificadas por genes MHC polimórficos.

A molécula HLA-DR estrutura-se a partir do polipeptídeo α codificado pelo gene *DRA* e pelo polipeptídeo β codificado pelo gene *DRB1*. O mesmo é observado para a molécula HLA-DQ e HLA-DP. Existem ainda, os locos *HLA-DOB*, *HLA-DMA* e *HLA-DMB*, *HLA-DOA*, que codificam para cadeias α e β respectivas. Em alguns haplótipos, além do gene *DRB1*, estão presentes outros genes *DRB* (*DRB3* ou *DRB4* ou *DRB5*) o que contribui para o aumento da diversidade das moléculas HLA-DR expressas por esses indivíduos.

- Genes da região MHC de classe III.

A região de classe III, localizada entre as regiões de classe I e II contém pelo menos 59 genes, possuindo a maior densidade gênica das três regiões. Há genes que atuam no processo de ativação do sistema complemento (*Bf*, *C2*, *C4A*, *C4B*) e genes da *21-hidroxilase*, da *hemocromatose*, *TNF* e *LTA* (que codificam as citocinas TNF- α e LT- α , respectivamente), além, de genes de susceptibilidade a doenças como a Doença de Graves, Doenças de Crohn, entre outros (MATSUZAKA *et al.* 2001).

FIGURA 3 – REPRESENTAÇÕES DAS MOLÉCULAS HLA DE CLASSE I E DE CLASSE II



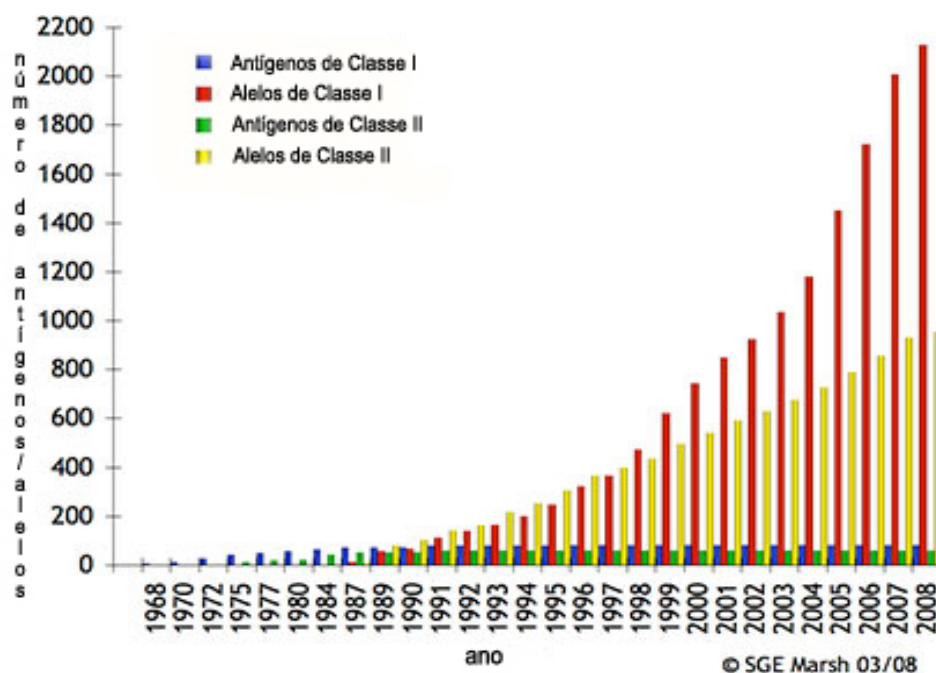
FONTE: ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. O Complexo Principal de Histocompatibilidade. In: **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p.65-81.

NOTA: Fig. 3.a) A representação da esquerda demonstra os domínios que compõem a molécula HLA de classe I. A representação da direita demonstra a interação entre uma molécula HLA de classe I com o peptídeo a ser apresentado aos linfócitos T CD8⁺. Fig. 3.b) A representação da esquerda demonstra os domínios que compõem a molécula HLA de classe II. A representação da direita demonstra a interação entre uma molécula HLA de classe II com o peptídeo a ser apresentado aos linfócitos T CD4⁺.

Outra característica da organização gênica do MHC é a baixa taxa de recombinação entre os genes aí situados, sendo estimada uma frequência de 4% entre os pontos extremos do MHC (GERAGHTY *et al.*, 1992). A combinação de alelos MHC, presentes em diferentes locos e transmitidos aos descendentes em conjuntos, é denominada haplótipo. Dessa forma, a transmissão dos alelos *HLA* é realizada em bloco, sendo que cada indivíduo possui dois haplótipos, um herdado do pai e outro da mãe.

O sistema gênico *HLA* também é reconhecido como o mais polimórfico do genoma humano (MUNGALL, 2003). Até o mês de junho de 2008 constavam no banco de dados do projeto IMGT (IMunoGeneTics Project) 649 alelos para o loco *HLA-A* e 1029 alelos para o *HLA-B*.

FIGURA 4 –POLIALLELISMO RELACIONADO AS PROTEÍNAS E ALELOS *HLA* DE CLASSE I E II



FONTE: Adaptado de: ANTHONY NOLAN RESEARCH INSTITUTE. **HLA Informatics Group**. Disponível em: <<http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/index.html>>. Acesso em: 03 jun. 08.

A presença de vários genes duplicados em função (codificar moléculas apresentadoras de antígenos), o alto polimorfismo e a expressão co-dominante de ambos os alelos no mesmo loco gênico contribuem para aumentar a diversidade das moléculas HLA expressas por um indivíduo (JANEWAY, 2002).

Essa diversidade de proteínas HLA maximiza a apresentação de antígenos para o sistema imune, num ambiente que apresenta uma extrema diversidade de patógenos a que os indivíduos estão potencialmente expostos. Dessa forma, existem vários estudos sobre como a seleção natural atua para favorecer a grande diversidade alélica observada nos genes *HLA*.

Um certo número de pesquisadores investiga a atuação das moléculas MHC na produção de um “odortipo” e na escolha de “parceiros para a reprodução” baseada no odor (JACOB *et al.*, 2002; OBER *et al.*, 1997; PEN e POTTS, 1999; SANTOS *et al.*, 2005; WEDEKIND *et al.*, 1995 YAMAZAKI *et al.*, 1976).

2.1.1.2. Olfato e MHC

A capacidade de identificar moléculas presentes no ar, através do ato de “cheirar”, proporciona aos seres vivos a capacidade de perceber o ambiente e desenvolver respostas propícias que permitam a sobrevivência e a reprodução. Essa habilidade torna o olfato primordial no reino animal, sendo utilizado para várias funções tais como: a identificação de alimentos, a localização de predadores, a demarcação de território, o acasalamento preferencial, o reconhecimento de prole entre outras possíveis funções a serem investigadas.

Evidências da influência do olfato sobre características comportamentais humanas vêm sendo reportadas freqüentemente, como por exemplo, o estudo realizado por MCCLINTOCK (1971), onde se observou sincronização dos ciclos menstruais de mulheres que convivem no mesmo ambiente.

Evidências crescentes são sugestivas de que o alto grau de polimorfismo dos genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) influencia no odor e no acasalamento preferencial em camundongos domésticos e em humanos (PEN e POTTS, 1999). Pesquisadores sugerem que o extraordinário polimorfismo observado nos locos do MHC seja mantido por uma seleção balanceadora que poderia estar atuando através de mecanismos associados a doenças infecciosas (APANIUS *et al.*, 1997).

A escolha preferencial de parceiros dependente do MHC atuaria favorecendo combinações MHC heterozigotas nos descendentes, proporcionando um aumento da resistência para doenças infecciosas. Existem estudos que associam o aumento do número de genes MHC em heterozigose com o aumento da resistência ao vírus HIV (CARRINGTON *et al.*, 1999). A heterozigosidade permitiria expressar uma maior variedade de moléculas HLA, que dessa forma teriam maior capacidade de apresentação de peptídeos antigênicos para os linfócitos do sistema imune.

Outra hipótese considerada é de que a seleção sexual dependente do MHC permitiria ao hospedeiro atuar como um “alvo-móvel” contra as parasitas que evoluem rapidamente e se adaptam aos genótipos MHC do hospedeiro (PEN e POTTS, 1999).

O princípio de “alvo-móvel” se refere à prole do hospedeiro que sempre possuirá genótipo distinto de seus progenitores. A cada nova geração descendente do progenitor ou hospedeiro inicial existiriam genótipos MHC distintos, impedindo dessa forma que os parasitas que se adaptaram ao sistema imune dos progenitores possam se disseminar por toda a população.

Outra hipótese evolutiva para explicar a existência de uma escolha preferencial de parceiros baseada no genótipo MHC é conhecida como *inbreeding avoidance hypothesis* (PEN e POTTS, 1999). O endocruzamento em camundongos domésticos tem um efeito extremamente negativo sobre a adaptatividade (MEAGHER *et al.*, 1999). Assim um sistema que permitisse evitar esse tipo de cruzamento seria extremamente vantajoso. Existem estudos que evidenciam que certos odores são utilizados para reconhecimento de parentesco em roedores (PORTER *et al.*, 1981).

Existem vários modelos teóricos que tentam explicar como o MHC influenciaria na produção do odortipo:

- **Hipótese da molécula MHC** – Por essa hipótese, as moléculas MHC ou fragmentos destas moléculas seriam diretamente responsáveis pela formação do “odortipo” em humanos e ratos (SINGH *et al.*, 1987; ROSER *et al.*, 1991). No entanto, experimentos posteriores não corroboram essa hipótese. No experimento realizado por SINGER *et al.* (1993), foi retirada a parte protéica da urina de ratos e, mesmo assim, os ratos continuaram a perceber odores MHC específicos. Outras evidências contra essa hipótese provêm dos estudos de BROWN *et al.* (1997) que demonstraram que ratos não identificam o odor de moléculas MHC de classe I purificadas da urina.
- **Hipótese da molécula carreadora** – Segundo PEARSE-PRATT *et al.* (1992), as regiões apresentadoras de antígenos das moléculas MHC são transformadas em moléculas carreadoras de substâncias voláteis. As moléculas voláteis, segundo BROWN (1995), teriam origem em bactérias comensais do intestino e seriam transportadas para a urina (ex: ratos) ou para o suor (humanos). Essa hipótese não contradiz aquela proposta por SINGER *et al.* (1993), uma vez que as moléculas MHC presentes na urina não formariam os odores corporais, e sim

atuariam apenas no transporte de moléculas odoríferas. Essa hipótese, porém, não explicaria como a região de ligação de peptídeo da molécula MHC, que apresenta uma conformação hidrofílica e sítio de ligação a peptídeos simples, adquiriria uma conformação hidrofóbica com sítio de ligação para moléculas aromáticas mais complexas.

- **Hipótese do peptídeo** – Muitas evidências são sugestivas de que os feromônios são transportados por proteínas carreadoras até as glândulas odoríferas (SPIELMAN *et al.*, 1995). SINGER *et al.* (1997) sugeriram que as moléculas MHC poderiam estar atuando no transporte de peptídeos e/ou metabólitos voláteis para serem processados nas glândulas odoríferas e formar o odor corporal do indivíduo. O MHC atuaria ligando-se de forma alelo-específico a determinados peptídeos, que seriam então devidamente processados para produção de metabólitos voláteis responsáveis pelo odor. Depois de realizado o transporte, as proteínas MHC presentes nas secreções não fariam parte do conjunto de moléculas responsáveis pelo odortipo, não contrariando os resultados observados no experimento realizado por SINGER *et al.* (1993).
- **Hipótese da microflora** – Através da sua atuação imunológica, as moléculas MHC poderiam atuar sobre a microflora, definindo dessa forma uma população alelo-específico de microorganismos comensais que estariam produzindo odores (HOWARD, 1977). Nos ratos, os odores da urina são influenciados por microorganismos presentes na glândula prepucial e próximos à cavidade genital. Experimentos realizados por NINOMIYA e BROWN (1995) demonstraram que as fêmeas não eram atraídas pelo macho MHC diferente quando sua glândula prepucial era removida. Outro estudo favorável a essa hipótese foi realizado por SCHELLINCK *et al.* (1995), no qual as fêmeas de ratos não rejeitavam a urina de outros ratos MHC-similares mantidos em ambiente estéril.
- **Hipótese da microflora e do peptídeo** – Essa hipótese seria uma unificação entre a hipótese da microflora e a hipótese do peptídeo, cujo argumento seria que moléculas MHC se ligariam de forma alelo-específico a determinados

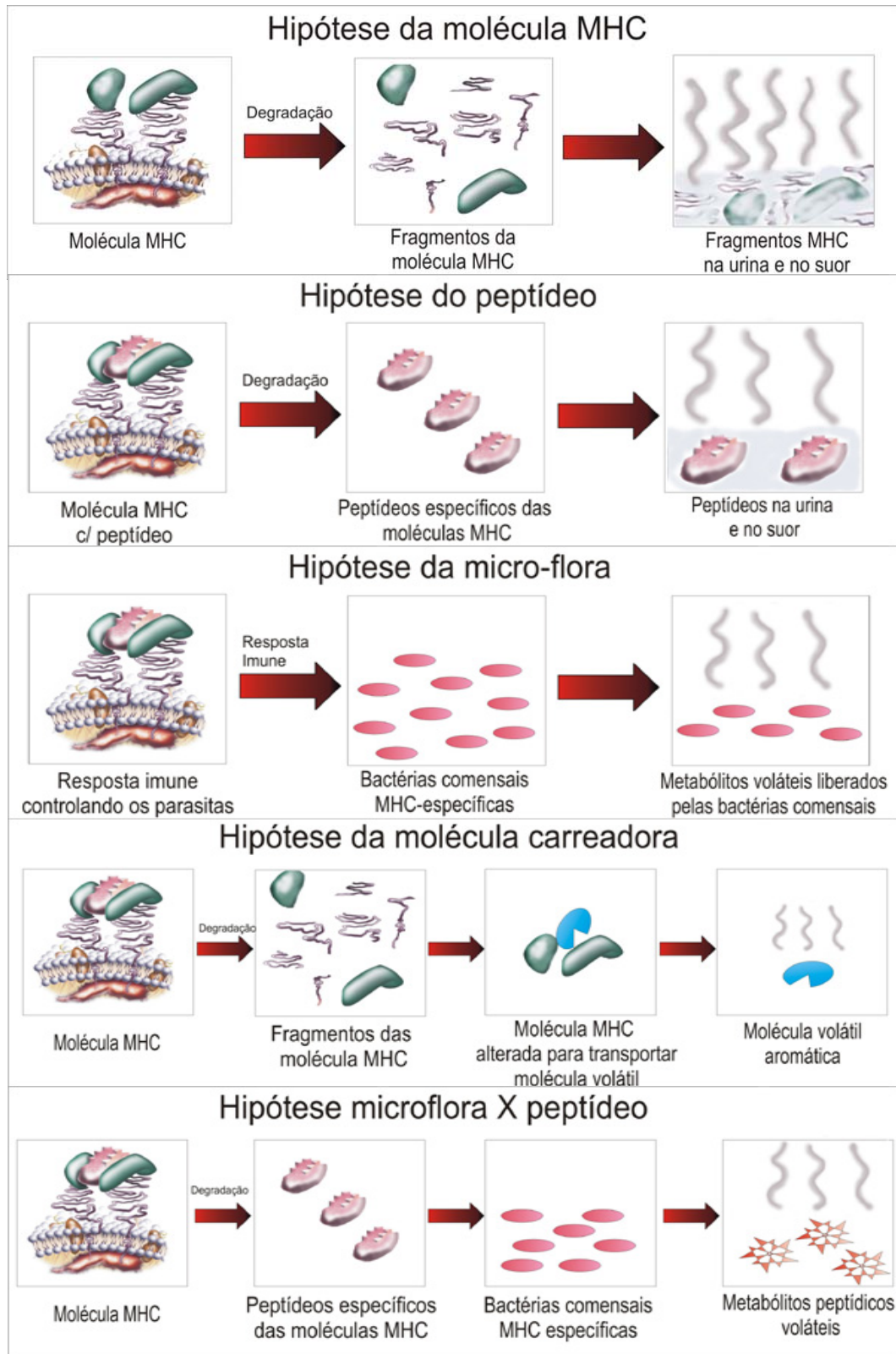
peptídeos que seriam transportados dessa maneira até regiões habitadas por microorganismos comensais (ex: glândula prepucial, as glândulas sudoríparas, entre outras localidades). Assim, após o transporte esses peptídeos seriam transformados em moléculas aromáticas voláteis (PENN e POTTS, 1998). Essa hipótese é considerada muito importante, pois explicaria porque ratos criados em ambientes estéreis tem a capacidade olfativa alterada em reconhecer odores de ratos MHC-similares (YAMAZAKI *et al.*, 1990).

Uma importante característica da região MHC que vem sendo atualmente referenciada é a presença de *clusters* de genes de receptores olfatórios (*OR*) próximos ao MHC clássico, numa região denominada como Complexo Principal de Histocompatibilidade estendido ou MHCx. Os estudos focados nessa região investigam a existência do desequilíbrio de ligação entre genes *OR* e os genes *HLA*. Também existe uma procura por polimorfismos nos genes *OR*. Tais achados podem ser sugestivos de um importante papel biológico relacionando haplótipos de genes *OR* e genes MHC clássicos com hábitos comportamentais, como por exemplo, na escolha preferencial de parceiros baseada no genótipo MHC.

Além da escolha preferencial, a região estendida do MHC parece estar envolvida com outras características comportamentais, como o tabagismo. BERGEN *et al.* (1999) realizaram estudos de varredura por marcadores moleculares no genoma humano para o hábito de fumar e encontraram importantes marcadores no cromossomo 6, próximos à região do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC).

FÜST *et al.* (2004), baseado no estudo anterior, pesquisou a incidência de certos haplótipos HLA e o hábito de fumar, encontrando associações significativas para frequência de certos alelos de genes da região do MHC de classe III. No entanto, provavelmente os receptores olfatórios localizados próximos ao MHC sejam os verdadeiros fatores envolvidos na dependência ao cigarro (FÜST *et al.*, 2004).

FIGURA 5 – MECANISMOS DE COMO O MHC ATUARIA NA FORMAÇÃO DO “ODORTIPO”



FONTE: MENGARELLI, R. R. **MHC E OLFATO**. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná. Orientador: Maria da Graça Bicalho, 2005.

2.1.2. MHC Estendido (MHCx)

A necessidade e o desejo de melhorar as taxas de sucesso nos transplantes motivaram um grande número de estudos que permitiram um detalhamento minucioso da região MHC. Esses esforços para caracterizar essa região em diversas espécies de vertebrados resultaram, em 1993, no mapa do MHC humano (CAMPBELL e TROWSDALE, 1993).

Posteriormente, em 1999, o seqüenciamento do cromossomo 6 forneceu o primeiro mapa baseado nas técnicas de seqüenciamento de DNA (THE MHC SEQUENCING CONSORTIUM, 1999). No entanto, a região MHC seqüenciada nesses estudos era derivada de diversos indivíduos de tipos HLA desconhecidos, gerando dessa forma um mosaico de genótipos possíveis, que seria uma representação virtual de haplótipos MHC (HORTON *et al.*, 2004).

Outras evidências, tais como a existência de um alto grau de desequilíbrio de ligação, a sintenia gênica conservada em diversas espécies de mamíferos e a presença de genes MHC relevantes estendendo-se para fora da região MHC clássica permitiram concluir que essa região seria bem maior do que aquela definida pelos mapas genéticos elaboradas até 1999. Em 2003, após o seqüenciamento completo do cromossomo 6, foi definida uma nova região de 7,6Mb no braço curto desse cromossomo como sendo o mapa do MHC estendido (HORTON *et al.*, 2004) (Figura 6).

Como característica principal, o MHCx apresenta diversos genes que sofreram um processo de duplicação gênica. O processo de duplicação originou a formação de diversos agrupamentos (*clusters*) gênicos, principalmente de genes relacionados à reposta imune. Seguindo a definição apresentada no trabalho publicado por HORTON *et al.* (2004), o MHCx é constituído por 6 *clusters* e 6 *superclusters*:

- *Histones superclusters*: histonas são proteínas básicas envolvidas na formação dos nucleossomos. São 66 locos gênicos, 55 expressos e 11 pseudogenes, representando o maior *cluster* de genes de histonas do genoma humano e o maior *supercluster* codificador de proteína dentro do MHCx.

- *Solute carrier cluster*: carreadores de solutos são genes que fazem parte de uma família diversa que não são bem compreendidas, mas que desempenham um papel fisiológico crucial no transporte de solutos e nutrientes.
- *HLA class I supercluster*: esse *cluster* é formado basicamente pelos mesmos locos gênicos que forma a região de classe I no MHC clássico mais o gene *HFE* (*Hemocromatose*).
- *tRNA supercluster*: os genes que codificam para os tRNAs são formados por apenas 75-90 pares de bases e são cruciais na síntese protéica. Esse *supercluster* presente no MHCx constitui o maior do genoma humano, contendo 157 genes tRNA, codificando para todos os principais aminoácidos, exceto para Asparagina e Cisteína.
- *Butyrophilin supercluster*: os genes da *Butirolifinas* (*BTN*) são membros da superfamília das imunoglobulinas e apresentam uma notável similaridade com outros locos do MHCx. O papel biológico dos genes *BTN* não foi definido ainda.
- *Vomeronal-receptor cluster*: os genes de receptores olfatórios do órgão vomeronasal são membros da família de receptores de feromônios, que estão envolvidos na percepção inconsciente de substâncias voláteis como os feromônios. Esse *cluster* apresenta exclusivamente pseudogenes, possivelmente devido a perda gradativa dessa via nos seres humanos.
- *Olfactory receptor supercluster*: esse *cluster* contém 34 locos gênicos, sendo que 14 desses são potencialmente funcionais. Similar aos genes envolvidos com a resposta imune, esses genes apresentam uma ferramenta essencial nos processos comportamentais, como na reprodução e caça. Também em comum com os genes da resposta imune, os genes *OR* apresentam um alto grau de polimorfismo.
- *Zinc-finger supercluster*: as proteínas que compõem esse grupo podem exercer diversas funções biológicas: enzimas, proteínas de armazenamento, proteínas da replicação e fatores transcricionais. As diversas proteínas

desse *cluster* são agrupadas não pela sua similaridade, mas sim devido à presença de certos domínios estruturais.

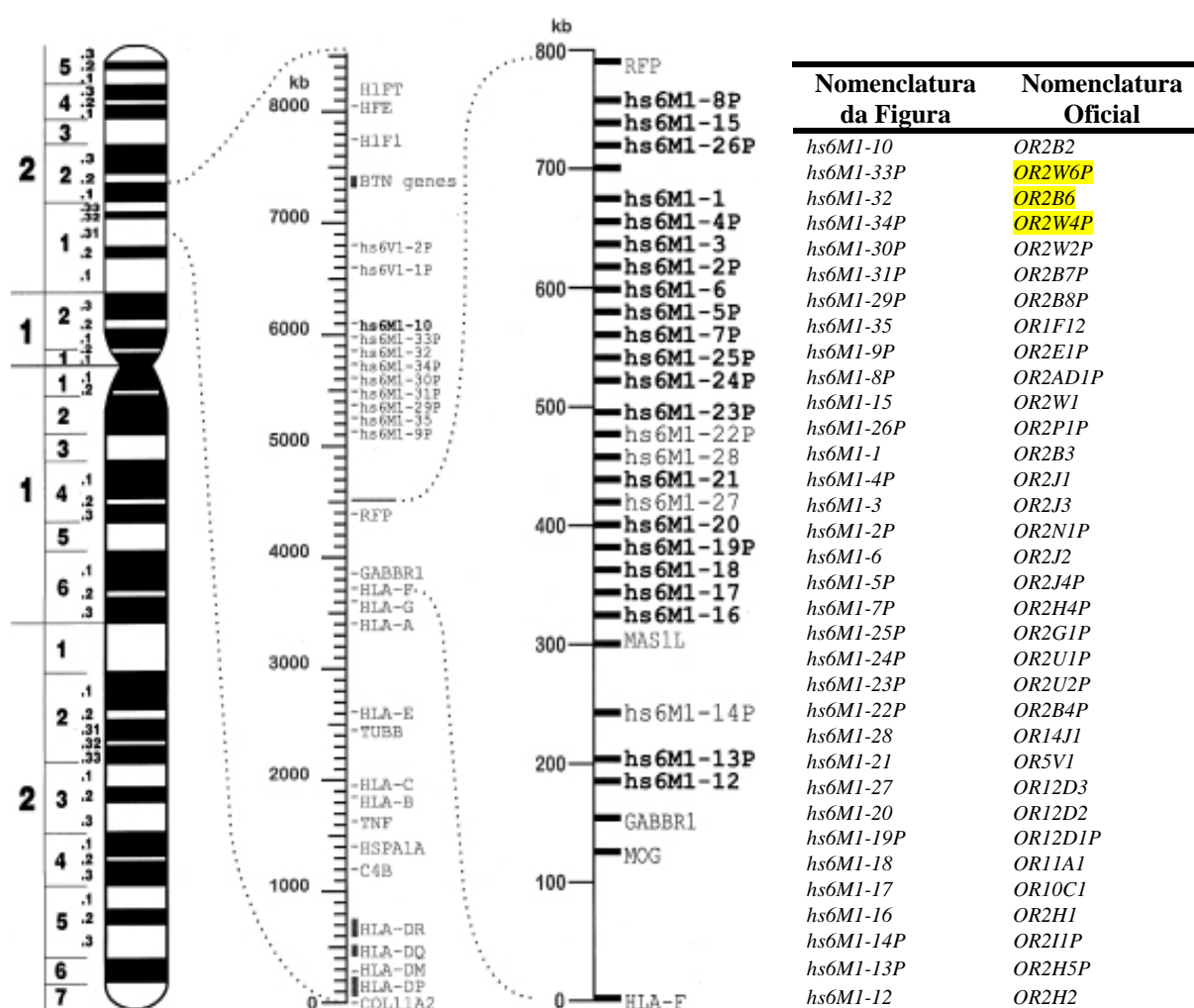
- *Tumor necrosis factor cluster*: esse agrupamento contém genes de 3 citocinas: TNF (Fator de necrose tumoral), LTA (Linfotoxina α) e LTB (Linfotoxina β).
- *Lymphocyte antigen cluster*: apresentam genes de antígenos linfocitários 6 (LY), que codificam as proteínas de superfície celular ancoradas ao glicosil-fosfatidil-inositol.
- *Heat shock cluster*: genes que codificam para as proteínas de choque térmico são expressos durante estresse celular como, por exemplo, o choque térmico. Essas proteínas podem desempenhar várias funções. Os três genes desse *cluster* participam da resposta imune, mediando a eliminação de células danificadas, infectadas ou malignizadas.
- *HLA class II cluster*: esse *cluster* é formado basicamente pelos mesmos locos gênicos que forma a região de classe II no MHC clássico.

Outra característica importante do MHCx é que muitos agrupamentos podem estar sendo mantidos ligados pelo processo evolutivo. No caso dos genes envolvidos na resposta imune, seria uma forma de organizar a co-expressão de genes que atuem numa mesma via (HORTON *et al.*, 2004). Outra forma de manutenção da ligação genética seria entre os genes *HLA* de classe I e sua proximidade com genes de tRNA. Como os genes de tRNA são altamente expressos, os genes MHC de classe I, expressos por todas as células nucleadas, estariam aproveitando da alta taxa de transcrição dessa região para aumentar a sua própria expressão.

2.1.2.1. Genes de receptores olfatórios ligados ao MHC

A descrição de genes de receptores olfatórios ligados ao MHC humano foi primeiramente realizada por FAN *et al.* (1995). Os genes *OR* foram mapeados no braço curto do cromossomo 6 (Figura 7). Esse *cluster* de receptores olfatórios é formado por aproximadamente 4,5Mb de seqüências genômicas contíguas (The MHC Sequencing Consortium, 1999).

FIGURA 7 – OS GENES DE RECEPTORES OLFATÓRIOS LIGADOS AO MHC



FONTE: Adaptado de: EHLERS, A.; BECK, S.; FORBES, S. A.; TROWSDALE, A. V.; YOUNGER, R.; ZIEGLER, A. MHC-linked olfactory receptor loci exhibit polymorphism and contribute to extended HLA/OR-haplotypes. **Genome Research**, New York, v.10, n.12, p.1968-1978, 2000.

NOTA: A nomenclatura oficial (HUGO) para os genes de receptores olfatórios humanos difere da figura original. Os nomes em destaque amarelo não foram identificados no GenBank como os genes citados na coluna a sua esquerda.

O *cluster* de receptores olfatórios ligados ao MHC pode ser dividido em duas sub-regiões segundo YOUNGER *et. al.*(2001): um agrupamento principal (*major*) e outro agrupamento secundário (*minor*). O agrupamento principal tem aproximadamente 800kb de extensão e é constituído por 25 locos de genes *OR* que são expressos no MOE (*Major Olfactory Epitelium*), dos quais doze apresentam matrizes de leitura aberta (*open reading frame*) e possivelmente são funcionais.

FIGURA 8 – DIAGRAMA REPRESENTATIVO DOS GENES DE RECEPTORES OLFATÓRIOS LIGADOS AO MHC

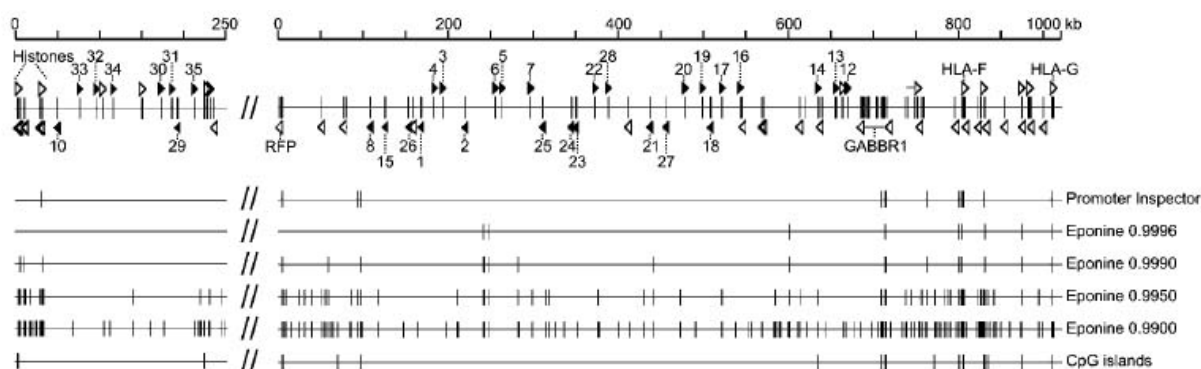


Diagrama mostrando os agrupamentos (*clusters*) principal e secundário dos receptores olfatórios na região estendida do MHC humano. A orientação utilizada é de telômero para centrômero. A letra “P” indica pseudogene e os prefixos hs6M1- foram omitidos para melhor visualização (VOLZ *et al.*, 2003).

É interessante ressaltar que o desequilíbrio de ligação observado entre genes *OR* e genes da região MHC na espécie humana também tem sido observado em outras espécies evolutivamente distintas, como por exemplo, os camundongos. Esse fato permite inferir uma provável interação entre essas duas classes de genes, e que mecanismos evolutivos tenham direcionado a ligação dos genes *OR* com o MHC em espécies distintas (ZIEGLER, DOHR e UCHANSKA-ZIEGLER, 2002)

2.2. RECEPTORES OLFATÓRIOS

Os genes de receptores olfatórios (*OR*), identificados em 1991 por Buck e Axel, constituem a maior família gênica dos vertebrados. Tamanha diversidade pode ser atribuída à necessidade de reconhecimento de milhões de odorantes. Esses genes são desprovidos de íntrons em sua região codificante (BUCK e AXEL, 1991), porém, existe um longo sítio de *splicing* na região 5' não traduzida (GLUSMAN *et al.*, 1996).

Os receptores olfatórios nos mamíferos são receptores acoplados à proteína G pertencentes à Classe I ou A, juntamente com os receptores para opsinas e catecolaminas (BOCKAERT e PIN, 1999). Essa classe de receptores constitui um dos maiores grupos de receptores de membranas existentes. Esses receptores reconhecem diversos tipos de ligantes: fótons, odorantes, nucleotídeos, nucleosídeos, peptídeos, lipídios e proteínas. Os receptores acoplados à proteína G podem ser agrupados em 6 tipos ou famílias e não apresentam similaridade de seqüências entre os grupos. No entanto, todos os grupos desses receptores apresentam um domínio central constituído de sete domínios transmembrana (TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM6 e TM7) unidos por “alças” (*loops*): três domínios intracelulares (i1, i2 e i3) e três domínios extracelulares (e1, e2 e e3) (BALDWIN, 1993).

Existem três famílias principais que podem ser reconhecidas comparando suas seqüências de aminoácidos: família 1, família 2 e família 3. As outras famílias não compartilham muitas similaridades entre as suas seqüências, demonstrando um exemplo de convergência molecular. Dentre as famílias apresentadas, a família 1, a família 3 e a família 4 constituem os grupos em que estão classificados os receptores olfatórios encontrados no MOE e no Órgão Vomeronasal (VNO).

Através das análises do seqüenciamento de 93% do genoma humano (PROJETO GENOMA HUMANO) foram descobertos por MALNIC *et al.* (2004) 636 genes candidatos a OR. O método utilizado na busca de genes candidatos OR foi a busca das seqüências do genoma humano depositadas no banco do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) utilizando a ferramenta TBLASTN. Essa ferramenta permite buscar por seqüências traduzidas em proteínas do banco de dados de seqüências do NCBI, digitando uma seqüência protéica de interesse. Através desse

método, os pesquisadores buscaram as seqüências dos motivos conservados nos OR, como o domínio transmembrana 3 (MAYDRYVAIC) e suas variantes (MALDRYVAIC e MAFDRYVAIC) e o domínio transmembrana 6 (KAFSTCASH).

Outras sete seqüências de OR de rato distintas também foram usadas na busca por possíveis seqüências de genes *OR* no banco de dados de seqüências do genoma humano. Em seguida, após esgotar a busca por todo o banco de dados, as seqüências escolhidas foram analisadas utilizando-se o programa ORF Finder (www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html). Através desse programa, as seqüências nucleotídicas foram traduzidas para obter a proteína codificada por elas. Para decidir quais eram seqüências de genes *OR* foram escolhidas aquelas que apresentavam uma região codificante de aproximadamente 1kb (quilobase) de comprimento e que continham ao menos 4 motivos (GN; MAYDRYVAIC, KAFSTCASH e PMLNPFIY) ou suas variantes em posições apropriadas.

Pela análise da matriz de leitura dos 636 *OR*, 339 destes foram considerados codificantes de receptores funcionais. O critério empregado para realizar a interpretação se uma seqüência codifica ou não um produto funcional foi baseado na presença de motivos considerados funcionais na seqüência protéica e que são conservados na maioria dos *OR*. Fragmentos pequenos de genes *OR* foram considerados como pseudogenes e não foram incluídos na análise.

Em ratos, menos de 5% dos genes *OR* encontrados são classificados como pseudogenes (ROUQUIER *et al.*, 1998). Estudo com primatas do continente Americano e do Africano permitiram investigar a proporção de pseudogenes para receptores olfatórios em seus respectivos genomas. Os pesquisadores compararam essa percentagem entre os vários primatas analisados. Os primatas que apresentavam os genes que permitiam a formação da visão tricromática apresentaram número significativamente alto de pseudogenes *OR* (GILAD *et al.*, 2004). Ambos os estudos, com roedores e primatas, permitem especular que durante a evolução pode ter ocorrido uma perda de importância do sentido olfatório nos humanos.

2.2.1. Distribuição Cromossômica dos Genes de Receptores Olfatórios no Genoma Humano

MALNIC *et al.* (2004) confirmaram que os genes de receptores olfatórios são encontrados em agrupamentos (*clusters*) por todo genoma, o que também havia sido observado em outros estudos anteriores (ROUQUIER *et al.*, 1998). MALNIC *et al.* (2004) localizaram 51 grupamentos diferentes, distribuídos em 21 cromossomos (Figura 10). Os cromossomos 8, 20 e o Y não apresentam genes *OR*.

Existe uma grande variação no número de genes nos grupamentos *OR*, podendo variar de 1 até 116. Também existe uma grande variação do número de genes *OR* encontrados em um determinado cromossomo, variando de 0 até 318 (MALNIC *et al.*, 2004).

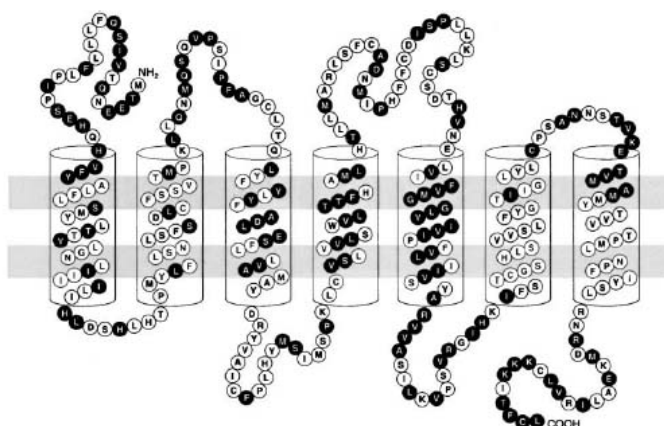
A composição dos tipos de família e subfamília de genes *OR* dentro de todos os agrupamentos estudados é única, sendo que 42% dos mesmos codificam para apenas um tipo de subfamília de genes *OR*. Essa organização de genes sustenta a idéia de que certos locos *OR*, até certo ponto, estão envolvidos na detecção de classes distintas de odorantes.

MALNIC *et al.*, 1999 bem como KAJIYA *et al.*, 2001, observaram que proteínas *OR* que possuem 60% ou mais de homologia entre suas seqüências de aminoácidos, reconhecem odorantes com estruturas relacionadas.

2.2.2. Produto protéico dos receptores olfatórios

Os receptores olfatórios são proteínas que apresentam sete domínios transmembrana e fazem parte da família de receptores acoplados à proteína G. Os domínios transmembranas são separados por 3 alças (*loops*) extracelulares e 3 alças intracelulares. A extremidade aminoterminal está localizada no meio extracelular e a extremidade carboxiterminal se apresenta no meio intracelular (Figura 9).

FIGURA 9 – EXEMPLO ESTRUTURAL DA PROTEÍNA DOS RECEPTORES OLFATÓRIOS



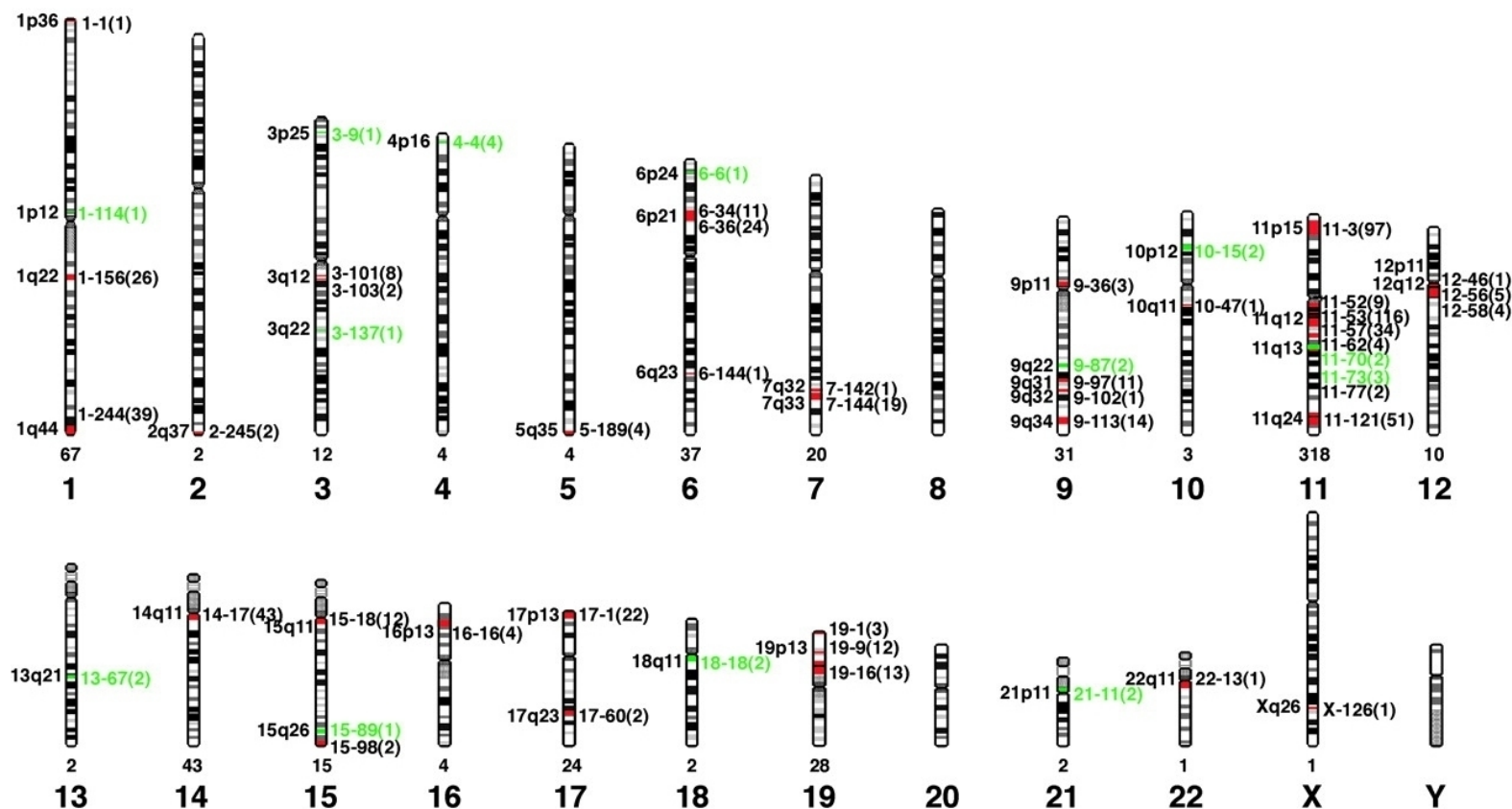
FONTE: BUCK, L.; AXEL, R. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. **Cell**, Cambridge, v.65, n.1; p.175-187, 1991.

NOTA: Essa figura apresenta uma proteína determinada como receptor olfatório. A proteína atravessa a membrana plasmática sete vezes, tendo sua ponta aminoterminal localizada no meio extracelular e sua extremidade carboxiterminal localizada no meio intracelular. Os cilindros verticais delimitam os sete motivos estruturais α hélices que atravessam a membrana. Aminoácidos representados por círculos pretos demonstram uma maior variabilidade entre as seqüências de outros OR comparadas.

Análise de múltiplas seqüências de proteínas OR alinhadas permitiu formular a hipótese de que, possivelmente, as regiões entre o segundo e o sexto domínio transmembrana formem a região de ligação à molécula odorífera. As seqüências de genes *OR* nos mamíferos apresentam grande diversidade nessas regiões de ligação ao odorante.

Utilizando o critério de GLUSMAN *et al.* (2000), genes *OR* que apresentem 40% ou mais de identidade na seqüências de aminoácidos do polipeptídeo correspondente, são considerados membros da mesma família. Genes *OR* que apresentam identidade na seqüência de aminoácidos entre si igual ou superior a 60% são considerados de mesma sub-família.

FIGURA 10 – LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE GENES *OR* HUMANOS



FONTE: MALNIC, B.; GODFREY, P. A.; BUCK, L. B. The human olfactory receptor gene family. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, n.8, p.2584-2589, 2004.

NOTA: Seiscentos e trinta genes de receptores olfatórios foram localizados em 51 locos cromossômicos diferentes distribuídos por 21 cromossomos humanos. Locos contendo um ou mais genes *OR* intactos estão indicados em vermelho; locos contendo apenas pseudogenes são indicados em verde. A posição citogenética de cada loco é mostrada à esquerda e sua distância em megabases do extremo do braço curto é mostrado à direita (cromossomo-Mb). O número de genes *OR* em cada loco é indicado entre parênteses e o número de genes *OR* em cada cromossomo é indicado abaixo.

2.2.3. Nomenclatura dos Genes *OR* em humanos

A padronização da nomenclatura dos genes de receptores olfatórios foi necessária, principalmente para auxiliar na denominação e posterior intercâmbio de dados das inúmeras seqüências descobertas e analisadas.

Muitas propostas foram sendo apresentadas para nomear as várias seqüências de genes *OR* que vem sendo descritas (ex: HGMP07E, R2C4, HPFH1OR, HSOLFMF, OR17-2, OLFR89, ZF2A, SCor35, gen147, entre outros).

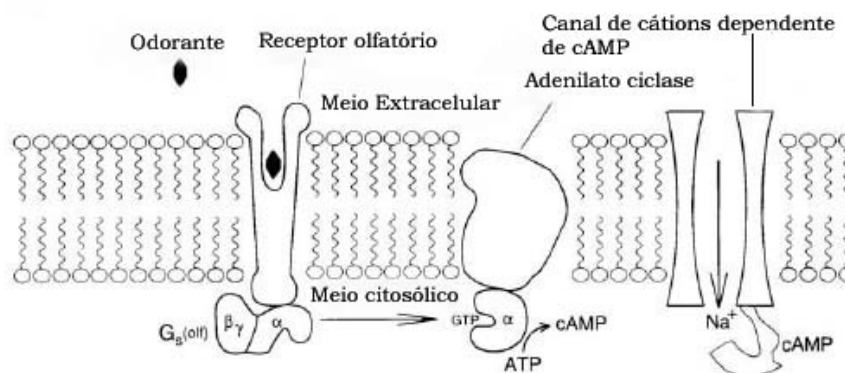
Dentre as nomenclaturas utilizadas, duas são consideradas mais importantes para entendimento dos trabalhos citados na área de estudo dos receptores ligados ao MHC. O sistema proposto por EHLERS *et al.* (2000) utiliza um prefixo “hs” (para referir-se ao *Homo sapiens*), seguido pelo número indicando o cromossomo em que essa seqüência nucleotídica se encontra, pela letra M ou V (M indicando gene relacionado ao sistema olfatório principal, V indicando gene relacionado ao órgão vomeronasal), e o algarismo referente ao loco gênico. A letra “P” ao final do nome representa que essa seqüência nucleotídica trata-se de um pseudogene.

A outra nomenclatura, a qual foi aprovada pelo HUGO (*Gene Nomenclature Committee*), é baseada em um sistema utilizando a classificação em famílias e sub-famílias. A nomenclatura consiste do símbolo OR, seguido por um algarismo representativo da família, uma letra representando a sub-família e um algarismo significando o gene individual dentro da sub-família. Por exemplo, “*OR3A1*” é a denominação utilizada para o gene de receptor olfatório da família 3, sub-família A, gene 1 da sub-família A. Outro exemplo que pode ser utilizado é a designação “*OR7E12P*” para o pseudogene (representado pela letra “P” ao final da nomenclatura) do receptor olfatório da família 7, sub-família E, pseudogene 12 da sub-família E.

2.2.4. Transdução de Sinal Mediada pelos Receptores Olfatórios

Os receptores olfatórios de mamíferos funcionam como receptores acoplados à proteína G. A ligação de um determinado odorante a seu receptor específico desencadeia a interação com uma proteína ligante de GTP ($G_s(\text{olf})$). Essa interação libera a sub-unidade α da proteína G, a qual estimula a adenilato ciclase a produzir níveis elevados de AMP cíclico. O aumento do AMP cíclico abre canais de cátions dependentes de nucleotídeos cíclicos. Essa abertura de canais de cátions leva à uma alteração no potencial de membrana, gerando impulsos elétricos.

FIGURA 11 – TRANSDUÇÃO DE SINAL MEDIADA PELOS RECEPTORES OLFATÓRIOS



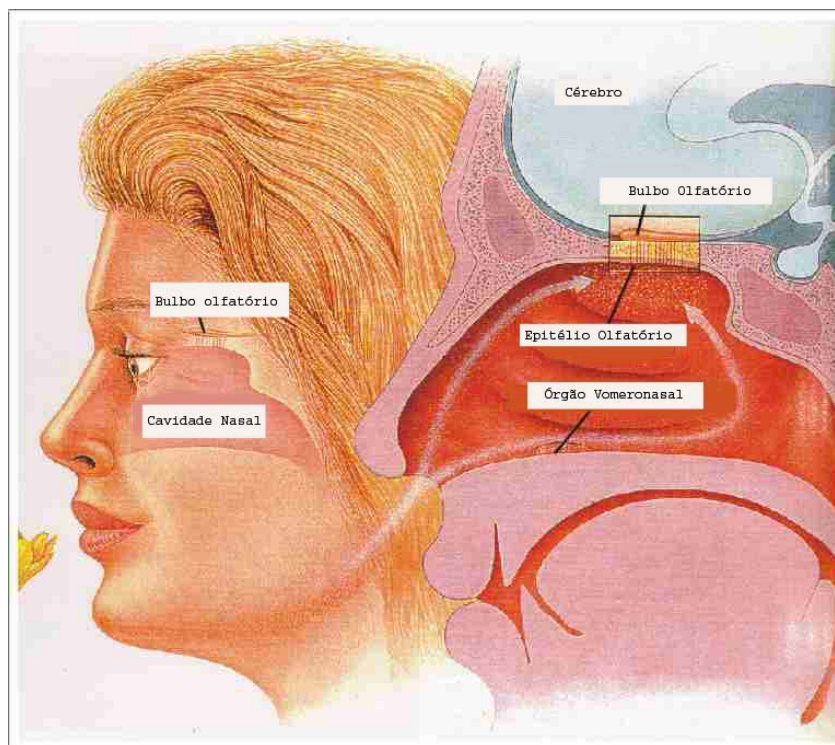
FONTE: BUCK, L.; AXEL, R. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. **Cell**, Cambridge, v.65, n.1; p.175-187, 1991.

2.2.5. Sistemas Quimiossensoriais e Receptores Olfatórios

Neurônios especializados, localizados em determinadas regiões anatômicas (SISTEMAS QUIMIOSSENSORIAIS), identificam partículas odoríferas (ODORANTE) presentes no ambiente. As interações entre a molécula de odor e seus respectivos receptores, ativam determinadas vias de transdução de sinal que ocasionam a despolarização do neurônio, gerando impulsos elétricos que são transmitidos até o cérebro.

São dois os principais sistemas quimiossensoriais envolvidos no sentido do olfato em mamíferos (figura 12): o epitélio olfatório principal (MOE) e o órgão vomeronasal (VNO).

FIGURA 12 – SISTEMAS QUIMIOSSENSORIAIS ASSOCIADOS AO SENTIDO DO OLFATO



FONTE: FRINGS, S. **Infoseite Zoophysiology**. Disponível em: <<http://www.sinnesphysiologie.de/olf/olf02al.jpg>>. Acesso em: 16/09/06.

NOTA: Ilustração representando o epitélio olfatório (onde está localizado o MOE) e o órgão vomeronasal.

Os neurônios sensitivos do órgão vomeronasal projetam seus axônios para o bulbo olfatório acessório e outras regiões do cérebro, incluindo a parte anterior do hipotálamo. Essa região do cérebro controla o sistema neuro-endócrino responsável por aspectos do comportamento e da fisiologia reprodutiva (BARTOSHUK e BEAUCHAMP, 1994; MONTI-BLOCH *et al.*, 1994).

O órgão vomeronasal humano (VNO) consiste de duas pequenas bolsas de 2mm de profundidade, cerca de 1cm a partir das narinas, abrindo-se em pequenas cavidades ocas com pequenos orifícios em seus centros, de cerca de 0,1 mm de

distância. Esse órgão quimiossensorial está associado com a detecção de determinadas moléculas não voláteis denominadas feromônios.

Os feromônios são compostos simples e de peso molecular relativamente baixo. Analisando a estrutura dessas moléculas verifica-se a existência de uma composição muito diversificada, variando a sua natureza com as diferentes espécies. Os feromônios já foram identificados sob as formas de derivados de ácidos graxos ou terpenos, álcoois, acetatos, hidrocarbonetos (frequentemente insaturados, com uma ou duas ligações duplas), substâncias aromáticas com grupos funcionais diversos, entre outras.

Os feromônios são moléculas que induzem mudança de comportamento, e geralmente estão associadas a comportamento sexual e à demarcação de território. Uma característica importante dessas moléculas é que elas são liberadas externamente e têm atividade sobre indivíduos da mesma espécie. Alguns pesquisadores, como J. B. S. Haldane (WILSON, 1985), consideram os feromônios como os precursores dos hormônios.

O epitélio olfatório principal está situado na parte distal da cavidade nasal, sendo a região no qual estão localizados neurônios sensitivos do olfato. A detecção de moléculas voláteis é função dos neurônios localizados nessa região. WANG *et al.*, 2003, encontraram evidências de que cada neurônio expressa apenas um tipo de receptor olfatório codificado por um dentre um vasto repertório de genes *OR*. Esses neurônios parecem estar distribuídos ao acaso pelo epitélio olfatório principal (RESSLER, SULLIVAN e BUCK, 1994; VASSAR *et al.*, 1994; MOMBAERTS *et al.*, 1996).

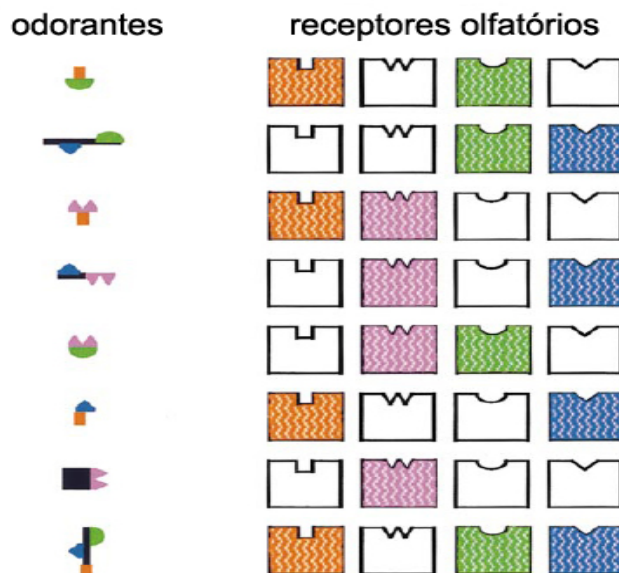
Os grupos de axônios dos neurônios sensitivos presentes no MOE se reúnem no interior do bulbo olfatório, formando estruturas denominadas de glomérulos. RESSLER, SULLIVAN e BUCK, (1994); VASSAR *et al.* (1994); MOMBAERTS *et al.* (1996), observaram em seus estudos que neurônios expressando o mesmo receptor olfatório, projetam seus axônios para os mesmos glomérulos no bulbo olfatório. Outro aspecto importante sobre o bulbo olfatório é que as regiões envolvidas na percepção de

certos odores são iguais em vários indivíduos, fundamentando a existência de um mapa sensorial.

MALNIC *et al.* (1999) realizaram estudos combinando técnicas de imagem da concentração de cálcio intracelular e *Reverse Transcription-PCR* para cada tipo de neurônio sensitivo a ser estudado. As imagens da concentração de Ca^{++} intracelular permitiram analisar a ativação de mecanismos de transdução de sinal pelos receptores olfatórios expressos por esses neurônios quando expostos a determinadas moléculas. Enquanto isso, a técnica de *RT-PCR* permitiu observar qual gene e alelo *OR* do genoma estava sendo expresso pelos neurônios estudados. Nesses experimentos foram testados vários genes *OR* de camundongos frente às moléculas semelhantes em estrutura química, porém que proporcionassem “percepção” de odores bem diferentes. Um exemplo citado no experimento é o caso das moléculas de ácido carboxílico e dos álcoois alifáticos. Quando testados quanto à percepção olfativa, ambos os grupos químicos, com o mesmo tamanho da cadeia carbono e variando apenas o grupo carboxila para o ácido carboxílico, e hidroxila para o álcool alifático, apresentam cheiros completamente diferentes. Os ácidos carboxílicos despertam sensações desagradáveis, descritas como cheiros de suor, mofo e azedo. Já, os álcoois são descritos como odores agradáveis, como essências florais, de ervas ou frutadas.

Os resultados obtidos por MALNIC *et al.* (1999) permitiram demonstrar que estruturas químicas semelhantes contendo o mesmo número de carbonos em suas cadeias, como no caso dos ácidos carboxílicos e os álcoois alifáticos, ativam os mesmos receptores olfatórios. No entanto, os ácidos carboxílicos ativam também outros receptores olfatórios não ativados pelas moléculas dos álcoois e vice-versa. Possivelmente a distinção entre moléculas tão semelhantes ocorre pela criação de códigos de ativação dos receptores olfatórios expressos pelo indivíduo. Dessa forma, uma molécula poderia ativar mais de um receptor e um receptor poderia ser ativado por mais de uma molécula. No entanto, cada molécula ativa apenas certa combinação de receptores olfatórios. O padrão de estímulos dos neurônios sensitivos gera um algoritmo complexo que o cérebro é capaz de interpretar e traduzir numa sensação.

FIGURA 13 – EXEMPLO DE COMO SÃO FORMADOS OS CÓDIGOS PARA ODORANTES ATRAVÉS DA COMBINAÇÃO DOS RECEPTORES OLFATÓRIOS



FONTE: MALNIC, B.; HIRONO, J.; SATO, T.; BUCK, L. B. Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*, Cambridge, v.96, n.5, p.713-723, 1999.

NOTA: Os receptores coloridos são os que reconhecem o odorante a sua esquerda. A identificação das diferentes moléculas odoríferas é feita pela interpretação dos distintos códigos de receptores olfatórios ativados. Diferentes moléculas podem ativar o mesmo neurônio e a mesma molécula pode ativar mais de um neurônio.

Nesse mesmo experimento, além da comparação da ativação de neurônios por parte de moléculas com estruturas químicas altamente relacionadas, foram analisadas e comparadas as variações na concentração das mesmas moléculas e o padrão de ativação dos neurônios sensitivos. Os mesmos foram testados para verificar se ocorria ativação com uma concentração de 100µM da molécula teste. Caso fosse detectada ativação, o teste era refeito com uma concentração de 10µM até 1µM.

Segundo os resultados, as sensibilidades dos diversos receptores olfatórios para a mesma molécula variavam com a concentração. Por exemplo, numa concentração “X” era ativado um número “Y” de neurônios. Quando a concentração baixava para 1µM da molécula teste, apenas uma pequena parte dos neurônios anteriores eram ativados. Dessa forma, dependendo da concentração da molécula do

odorante, existia uma variação nos tipos de receptores olfatórios ativados, o que resultava num código distinto para o cérebro interpretar. Um exemplo interessante é o indol, que em altas concentrações apresenta um odor pútrido, no entanto, quando diluído, essa mesma molécula apresenta um aroma floral.

3. OBJETIVOS GERAIS

Como parte de um trabalho colaborativo e complementar àquele realizado por EHLERS *et al.* (2000) do grupo de pesquisa *Institut für Immunogenetik, Charité*, Universidade Livre de Berlim, o objetivo geral é caracterizar os genes *OR2IIP*, *OR12D3*, *OR14J1*, *OR2B4P*, *OR2E1P*, *OR1F12*, *OR2B8P*, *OR2B7P*, *OR2W2P*, *OR2W4P*, *OR2B6* e *OR2W6P* nas 10 linhagens celulares humanas a seguir relacionadas: BM28.7, BM19.7, LG2, KR3598, H2LCL, WT51, SA, YAR, OLGA e AMAI.

Esses resultados juntamente com aqueles obtidos por EHLERS *et al.* (2000) possibilitarão uma melhor caracterização da região do MHCx onde situam-se os *clusters* de genes *OR*.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implantar e avaliar a eficácia da técnica de seqüenciamento de genes *OR* em linhagens celulares para obtenção de genótipos de referência, sem ambigüidades de tipagem, e que possam fundamentar futuros estudos relacionados aos genes *OR*;
- Investigar a existência de polimorfismos de nucleotídeo único (*SNP*) nos genes *OR* através da técnica de seqüenciamento;
- Comparar e comentar nossos resultados com aqueles obtidos por EHLERS *et al.* (2000).

4. JUSTIFICATIVA

O presente trabalho justifica-se pelo crescente número de artigos relacionando os receptores olfatórios com a biologia comportamental e evolutiva. São várias as hipóteses que associam o sentido do olfato e o reconhecimento de indivíduos aparentados (PORTER *et al.*, 1981), escolha preferencial de parceiros baseados no genótipo MHC (JACOB *et al.*, 2002; OBER *et al.*, 1997; PEN e POTTS, 1999; SANTOS *et al.*, 2005; WEDEKIND *et al.*, 1995 YAMAZAKI *et al.*, 1976), seleção em nível de gametas (*Sperm Receptor Selection*) (ZIEGLER, DOHR e UCHANSKA-ZIEGLER, 2002), além de outras influências comportamentais, como uma possível tendência ao hábito tabagista associada a certos haplótipos *HLA* (FÜST *et al.*, 2004). No entanto, faltam algumas informações sobre os genes *OR* situados no MHCx, tais como a presença de polimorfismos e outras características gênicas estruturais relacionadas a seqüências reguladoras, entre outras. Dessa forma, o presente trabalho, que pretende investigar e caracterizar os genes *OR*, reveste-se de uma grande importância pelo potencial de obtenção de dados e informações que se somarão àquelas já obtidas pelo grupo de pesquisa do *Institut für Immunogenetik, Charité*, Universidade Livre de Berlim, contribuindo para um melhor entendimento do papel biológico que os genes *OR* possam exercer.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foram utilizadas dez linhagens celulares humanas, de diversos grupos raciais e étnicos e com diferentes haplótipos HLA (Tabela 1). Essas linhagens foram fornecidas gentilmente pelo *Institut für Immunogenetik, Charité*, Universidade Livre de Berlim, tendo sido utilizadas por EHLERS *et al.* (2000) para investigação de polimorfismo em genes *OR* situados no MHCx.

Oito dessas linhagens são homozigotas para os genes *HLA* clássicos. As linhagens BM19.7 e BM28.7 são *HLA* hemizigotas, oriundas de uma única célula diplóide. As duas linhagens hemizogotas foram produzidas pelo *Institut für Immunogenetik, Charité*, através de radiação gama, seguido de seleção com anticorpos monoclonais produzidos contra certas especificidades HLA (SPRING *et al.*, 1985).

A linhagem BM28.7, que possui a tipagem sorológica A1,-B35, Bw6, perdeu parte do braço pequeno do cromossomo 6, incluindo o loco *HLA-A*. A linhagem BM19.7, que possui a tipagem A2, B13, Bw4, perdeu um cromossomo 6 inteiro, sendo haplóide para o cromossomo 6.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DAS LINHAGENS CELULARES PESQUISADAS

CARACTERÍSTICAS	LINHAGENS CELULARES									
	BM28.7	BM19.7	LG2	KR3598	H2LCL	WT51	SA	YAR	OLGA	AMAI
ETNIA	NEGRO	NEGRO	CAUCASIANO	CAUCASIANO	CAUCASIANO	CAUCASIANO	JAPONES	JUDEU	AMERÍNDIO	ALGERIANO
HLA	A1,	A2,	A2,	A2,	A3,	A23,	A24,	A26,	A31,	A68,
	B35	B13	B27	B44	B7	B65	B7	B38	B62	B53
HAPLÓTIPO <i>OR</i> *	7	8	2	11 E 12	1	9 E 10	5 E 6	1	3 E 4	13

* Os haplótipos de genes *OR* citados nesta tabela correspondem aos encontrados no trabalho de EHLERS *et al.* (2000).

5.2 CULTIVO CELULAR E EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Estas etapas foram realizadas pelo *Institut für Immunogenetik, Charité*, Universidade Livre de Berlim, Alemanha. As linhagens celulares foram replicadas em meio RPMI 1640 contendo antibióticos e 10% de soro fetal bovino (EHLERS *et al.*, 2000). A extração de DNA das linhagens celulares foi realizada seguindo o protocolo do “kit” comercial “Invisorb® Spin Blood Maxi Kit” da Invitex GmbH. O protocolo está disponível no endereço eletrônico da empresa: <http://shop.invitek.de/pimages/f7f956c9bfb0d4ef439a7285951eade1_Spin%20Blood%20Maxi%200807.pdf>. (acesso no dia 08 de dezembro de 2007).

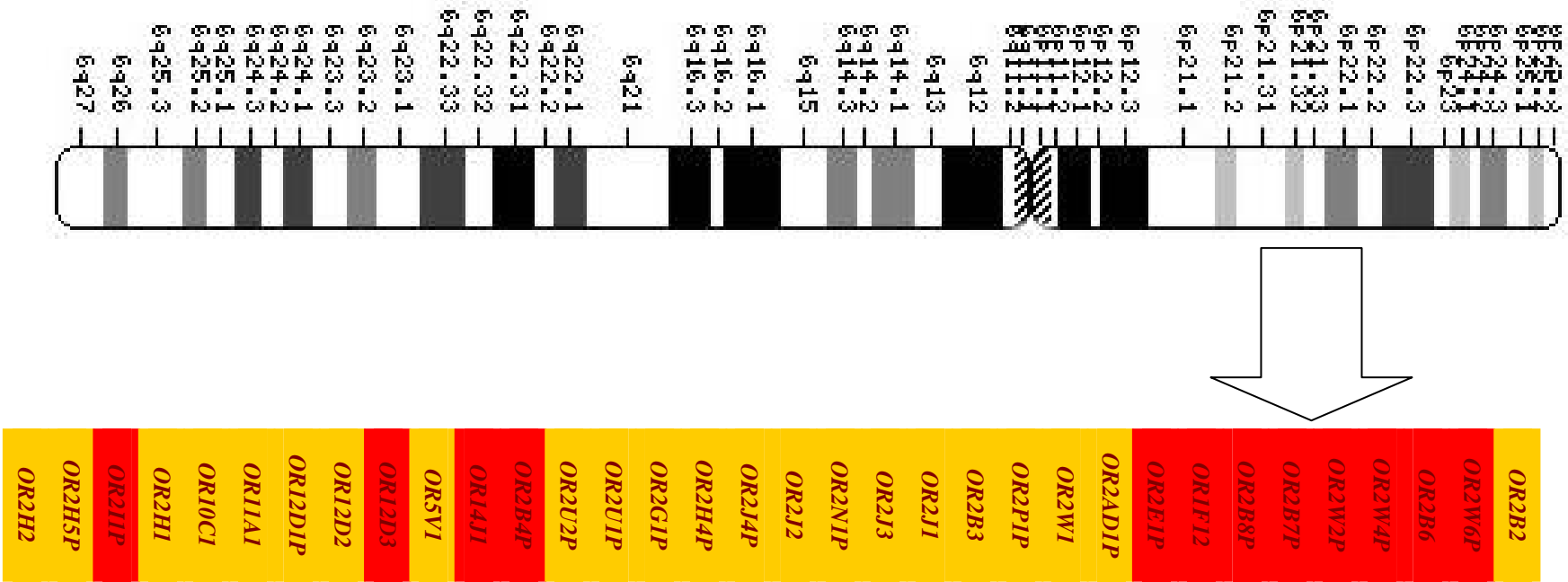
5.3. QUANTIFICAÇÃO DO DNA OBTIDO NA ETAPA DA EXTRAÇÃO

Para o uso do DNA extraído nas técnicas de PCR empregadas nos experimentos, foi necessário o conhecimento da concentração e pureza deste material. Para quantificar o DNA da amostra foi utilizada a leitura de absorbância (λ) através do espectrofotômetro “Gene Quant^{pro} RNA/DNA calculator” da Pharmacia Biotech.

5.4. SEQUENCIAMENTO DOS GENES DOS RECEPTORES OLFATÓRIOS

No estudo dos genes dos receptores olfatórios presentes no MHCx foram analisados 12 (doze) locos gênicos, destacados na Figura 14 em vermelho. Esses locos foram escolhidos para completar o estudo dos genes (em amarelo) que foram investigados pelo grupo *Institut für Immunogenetik, Charité*, Universidade Livre de Berlim e cujos resultados se complementarão para melhor entendimento da organização dos genes *OR*.

FIGURA 14 – GENES OR LIGADOS AO MHC ANALISADOS NESTE ESTUDO



NOTA: A figura representa o cromossomo 6 e a Tabela colorida os genes OR ligados ao MHC. Os genes analisados nesse estudo estão pintados de vermelho e os genes analisados no trabalho de EHLERS *et al.* (2000) estão pintados de amarelo.

5.4.1. Desenvolvimento dos Oligonucleotídeos Iniciadores (*Primers*) para os Genes *OR*

Para desenvolver os iniciadores utilizados neste estudo, foram obtidas as seqüências de genes *OR* presentes no banco de dados para receptores olfatórios (HORDE) do *Weizmann Institute of Science*.

Em seguida, as seqüências nucleotídicas dos genes alvo foram utilizadas para localizar os clones no Genbank do NCBI. As seqüências dos clones foram então utilizadas para desenvolver os iniciadores com o uso do programa de computador “*Primer Select*” v.5.03 da empresa DNASTAR.

A estratégia empregada no desenvolvimento dos iniciadores visou compreender todas as regiões correspondentes aos domínios transmembranas das proteínas para investigar a presença de polimorfismos (SNPs) nessas estruturas, uma vez que estudos indicam sua participação na interação com o odorante (BUCK e AXEL, 1991).

Os *primers* desenvolvidos foram verificados quanto à sua especificidade utilizando a ferramenta BLASTN no site do NCBI. As seqüências nucleotídicas dos iniciadores foram utilizadas para verificar se essas anelavam-se a outras regiões do genoma humano. Apenas os iniciadores que não se anelaram a outras regiões foram selecionados para realizar as reações de seqüenciamento.

TABELA 2 – RELAÇÃO DOS INICIADORES DESENVOLVIDOS

GENE <i>OR</i>	UPPER PRIMER (5'→3')	LOWER PRIMER (5'→3')
<i>OR1F12</i>	CTGGCAAAAATATTTTCATTCTCTGGGT	GGAGAAGATTTTCTTTGGCTTAGGGT
<i>OR2B6</i>	AGAAATACTTTGGTAATTATGAGCATT	AAAAATAGGGCAACTTACAGAGAAG
<i>OR2B7P</i>	CAACAAGAAAGAGACTGCAAAAACACC	CTCAGCAGTCTTCTAGTGACAAATGT
<i>OR2B8P</i>	GGATGACACATGGAGAACGCATA	CATGGCCATGTCTTGTACAAATGATA
<i>OR2E1P</i>	ATAGAATGCTGTAGCAGATCTCAAAGG	CTGTCTTCAGAACTTCTACCAACTCAG
<i>OR2I1P</i>	GGTGATCATTCTGCCTACCGAGTGT	AATACTTTCTCCCCTCCCCAACTACT
<i>OR2W2P</i>	ATTAAGAATATGGTGTGCTCCTATCGC	TAAGTATTCCCAAGTTCTGCCTCTGTA
<i>OR2W4P</i>	TTGTCCTACTAGCTATACAGATGATG	TTTAAAAATCCAAGAATGTTTGATACA
<i>OR2W6P</i>	TCTCTGCTATTACAGGCATTTCATCTT	CCCCATCTCATTAAATGCCTCTTCAG
<i>OR14J1</i>	CTTTGGCTTCCTAAACAGAGTCACAC	AACAATGCCTTTCATTTGTATGGTTC
<i>OR12D3</i>	GTGTTTCTTGAACCTACTACACTGCCT	CTATTCTTCACACTGTTGCTCACCC
<i>OR2B4PU</i>	GCTTCCTCCTACTGTTGATGTCTATCC	TCAAACACATCTATCCTCGCTTCTTAG

5.4.2. Reação de Amplificação dos Genes *OR* (*OR2I1P*, *OR12D3*, *OR14J1*, *OR2B4P*, *OR2E1P*, *ORF1F12*, *OR2B8P*, *OR2B7P*, *OR2W2P*, *OR2W4P*, *OR2B6*, *OR2W6P*)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada utilizando-se os componentes citados na Tabela 3 em microtubos de 200µl.

TABELA 3 – REAGENTES UTILIZADOS PARA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO

Reagentes	Volume/Quantidade
DNA molde	50ng
Tampão Taq 10X	5,0µl
MgCl ₂ (50mM)	1,0µl
dATP (10mM)	0,2µl
dGTP (10mM)	0,2µl
dCTP (10mM)	0,2µl
dTTP (10mM)	0,2µl
Primer <i>OR_U</i> (10µM)	1,0µl
Primer <i>OR_U</i> (10µM)	1,0µl
Enzima <i>Taq polimerase</i>	0,2µl
Água (18,2MΩcm)	q.s.p. 50µl

Os microtubos preparados com os reagentes foram submetidos às condições apresentadas na Tabela 4 (no termociclador TC-512 da Techne).

TABELA 4 – CONDIÇÕES DE CICLAGEM UTILIZADAS NA PCR

N° DE CICLOS	TEMPERATURA	TEMPO
1 ciclo	96°C	2 minutos
20 ciclos	96°C	30 segundos
	61-57°C*	30 segundos
	72°C	3 minutos
20 ciclos	96°C	30 segundos
	57°C	30 segundos
	72°C	3 minutos
1 ciclo	72°C	10 minutos
1 ciclo	4°C	∞

5.4.3. Purificação das Amostras de Genes *OR* Amplificados

Antes de prosseguir com a reação de seqüenciamento é necessário purificar os produtos de PCR, pois a presença de nucleotídeos livres e primers residuais comprometem a análise do seqüenciamento.

Os produtos de PCR obtidos foram purificados através do método enzimático utilizando as enzimas Exonuclease I (EXO I) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) da USB Corporation®. Esse método consiste na atividade nuclease da EXO I em degradar oligonucleotídeos simples fita (*primers*) e na atividade da SAP de desfosforilar nucleotídeos trifosfatos (dNTPs) não incorporados durante a reação de PCR. Essas enzimas têm atividade ótima na temperatura de 37°C e são desnaturadas a temperatura superior a 65°C por um tempo de 15 minutos.

Os reagentes foram utilizados nas concentrações presentes na Tabela 5 e submetidos às condições de ciclagem presentes na Tabela 6 no termociclador TC-512 da Techne.

TABELA 5 - REAGENTES UTILIZADOS NA ETAPA DE PURIFICAÇÃO

Reagentes	Volume/Quantidade
Produto de PCR	10µl
Tampão de Reação SAP 10X	1,0µl
EXO I (10U/µl)	1,0µl
SAP (1U/µl)	2,0µl

TABELA 6 - CONDIÇÕES DE CICLAGEM UTILIZADAS NA ETAPA DE PURIFICAÇÃO

N° DE CICLOS	TEMPERATURA	TEMPO
1 ciclo	37°C	1 hora
1 ciclo	80°C	15 minutos

5.4.4. Sequenciamento, Precipitação e Denaturação das Amostras de Genes *OR* Amplificados

Após a purificação dos produtos de PCR, essas foram sequenciadas com o “*kit BigDye 3.1 Terminator*” (Applied Biosystems), conforme o protocolo da Tabela 7.

TABELA 7 - REAGENTES UTILIZADOS NA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Reagentes	Volume/Quantidade
Terminator Ready Mix	3µl
Produto de PCR purificado	6µl
<i>Primers</i> específico (U ou L)	3,2pmol
Água (18,2MΩcm)	q.s.p. 10µl

Além das amostras, o aparelho deve ser calibrado utilizando-se o controle fornecido com o *kit* (Tabela 8).

TABELA 8 - REAGENTES UTILIZADOS NA CALIBRAÇÃO ESPECTRAL

Reagentes	Volume/Quantidade
Terminator Ready Mix	4µl
<i>P-Gen</i> (plasmídeo controle)	1µl
<i>Primers</i> específico (<i>kit</i>)	4µl
Água (18,2MΩcm)	q.s.p. 10µl

Os microtubos preparados com os reagentes foram submetidos às condições de ciclagem descritas nas Tabelas 9 e 10 (no termociclador TC-512 da Techne).

TABELA 9 - CONDIÇÕES DE CICLAGEM UTILIZADAS NAS REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO DOS GENES *OR2IIP*, *OR12D3*, *OR14J1*, *OR2B4P*, *OR2E1P*, *OR1F12*, *OR2B8P*, *OR2B7P*, *OR2W2P*, *OR2W6P*

N° DE CICLOS	TEMPERATURA	TEMPO
1 ciclo	96°C	1 minuto
35 ciclos	96°C	15 segundos
	50°C	15 segundos
	60°C	4 minutos
1 ciclo	4°C	∞

TABELA 10 - CONDIÇÕES DE CICLAGEM UTILIZADAS NAS REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO DO GENES *OR2W4P* e *OR2B6*

Nº DE CICLOS	TEMPERATURA	TEMPO
1 ciclo	96°C	1 minuto
35 ciclos	96°C	15 segundos
	55°C	15 segundos
	60°C	4 minutos
1 ciclo	4°C	∞

Posteriormente, as amostras foram precipitadas com acetato de amônia 7,5M e etanol 96% para obtenção dos diversos fragmentos amplificados e retirada dos iniciadores, terminadores fluorescentes e outras impurezas. O produto purificado foi ressuspenso em 15µl de formamida e desnaturado a 96°C por 8 minutos no termociclador TC-512 da Techne, seguido por choque térmico em freezer -80°C por 40 segundos. Por fim, os fragmentos foram analisados em sequenciador automático ABI-3130 *Applied Biosystems*, polímero POP7 e capilar de 80cm. Os dados obtidos foram coletados pelo programa Data Collection v.3.0 (fornecido pela Applied Biosystems) para análise posterior.

5.5. CARACTERIZAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DOS GENES DE RECEPTORES OLFATÓRIOS LIGADOS AO MHC

Os dados coletados pelo programa Data Collection v.3.0. oriundos das reações de sequenciamento no sequenciador automático ABI-3130 *Applied Biosystems* foram gravados em CD e transferidos para o computador de análise.

Em seguida, os arquivos de extensão “.ab1” foram analisados pelo programa Sequencing Analysis v.5.2 fornecido junto com o sequenciador automático ABI-3130 *Applied Biosystems*. Por fim, utilizou-se o programa SeqScape v.2.5 (*Applied Biosystems*) para pareamento das seqüências obtidas com as presentes no GenBank do NCBI.

6. RESULTADOS

6.1. RESULTADOS DO PROCESSO DE IMPLANTAÇÃO E AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO DE GENES *OR*

Para implantação da técnica de sequenciamento foi necessário a consulta a protocolos básicos como Sambrook, onde se procurou observar itens técnicos e reagentes imprescindíveis para a realização da técnica de sequenciamento. Além disso, usamos como referência as recomendações dos fabricantes dos reagentes do *Kit BigDye Terminator* (Applied Biosystem).

Os protocolos recomendados foram testados e a partir do momento de sua validação iniciou-se o processo de implantação da técnica de sequenciamento, cujos resultados estão na Tabela 11.

TABELA 11 – NÚMERO DE PARES DE BASES DE GENES *OR* SEQUENCIADOS

GENES <i>OR</i>	LINHAGENS CELULARES									
	LG2	YAR	BM28.7	BM19.7	KR3598	OLGA	SA	WT51	AMAI	H2LCL
<i>OR2W6P</i>	938/998	938/998	938/998	938/998	938/998	938/998	938/998	938/998	938/998	938/998
<i>OR2B6</i>	939/939	939/939	939/939	939/939	939/939	939/939	939/939	939/939	939/939	939/939
<i>OR2W4P</i>	897/923	897/923	897/923	897/923	897/923	897/923	897/923	897/923	897/923	897/923
<i>OR2W2P</i>	948/948	948/948	948/948	948/948	948/948	948/948	948/948	948/948	948/948	948/948
<i>OR2B7P</i>	935/935	935/935	0/935	935/935	0/935	0/935	0/935	935/935	935/935	935/935
<i>OR2B8P</i>	950/950	950/950	950/950	950/950	950/950	950/950	950/950	950/950	950/950	950/950
<i>OR1F12</i>	0/921	0/921	0/921	0/921	0/921	0/921	0/921	0/921	0/921	0/921
<i>OR2E1P</i>	474/474	474/474	474/474	474/474	474/474	474/474	474/474	474/474	474/474	474/474
<i>OR2B4P</i>	955/955	955/955	955/955	955/955	955/955	955/955	955/955	955/955	955/955	955/955
<i>OR14J1</i>	963/963	963/963	963/963	963/963	963/963	963/963	963/963	963/963	963/963	963/963
<i>OR12D3</i>	766/948	766/948	766/948	766/948	766/948	766/948	766/948	766/948	766/948	766/948
<i>OR2I1P</i>	945/972	945/972	945/972	945/972	945/972	945/972	945/972	945/972	945/972	945/972

LEGENDA: Foi utilizada a seguinte notação: XXX/YYY, onde XXX corresponde ao número de pares de bases sequenciados e YYY o número de pares de bases que possui a sequência no banco de dados para receptores olfatórios do Instituto Weizmann (HORDE). Foram utilizadas as cores: vermelha para as linhagens celulares que não puderam ser analisadas, azul para as linhagens que foram sequenciadas parcialmente e verde para as linhagens que tiveram toda a sequência analisada.

6.2. POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNP)

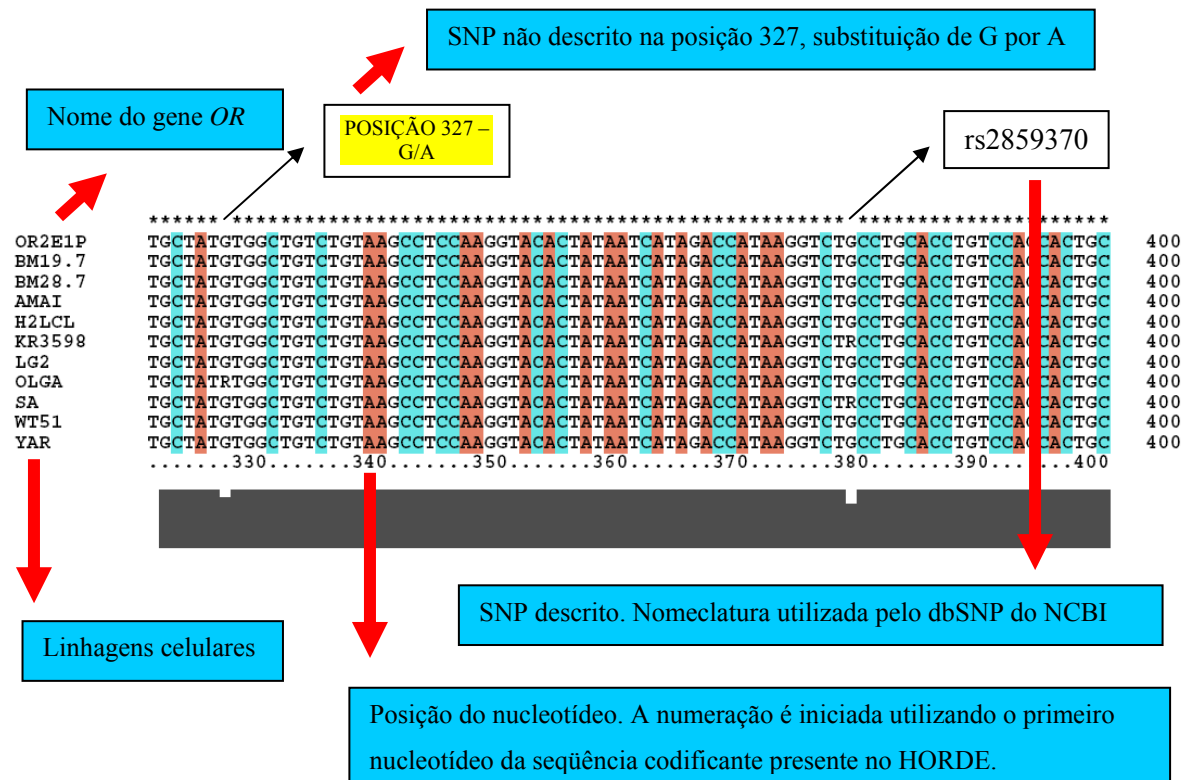
Após análise utilizando o programa SeqScape v.2.5 (Applied Biosystems), as seqüências obtidas foram alinhadas e analisadas com as contidas no banco de dados HORDE do *Weizmann Institute of Science*. Os SNPs encontrados foram comparados com os presentes nos bancos de dados do HORDE e do dbSNP (no site do NCBI). As imagens de alinhamentos foram dispostas de modo a identificar os SNPs presentes nas seqüências obtidas nesse experimento. Os SNPs novos foram destacados com a caixa de texto contendo fundo amarelo, na qual consta sua posição e as variantes encontradas.

TABELA 12 – NÚMERO DE SNPs NOS GENES *OR* SEQUENCIADOS

GENES <i>OR</i>	LINHAGENS CELULARES									
	LG2	YAR	BM28.7	BM19.7	KR3598	OLGA	SA	WT51	AMAI	H2LCL
<i>OR2W6P</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>OR2B6</i>	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0
<i>OR2W4P</i>	0	0	0	0	2	1	0	1	1	0
<i>OR2W2P</i>	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0
<i>OR2B7P</i>	0	0	-	2	-	-	-	0	3	0
<i>OR2B8P</i>	0	0	5	5	2	3	4	0	4	0
<i>OR1F12</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>OR2E1P</i>	0	0	1	0	2	1	2	1	0	0
<i>OR2B4P</i>	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
<i>OR14J1</i>	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1
<i>OR12D3</i>	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1
<i>OR2I1P</i>	1	1	0	0	2	2	2	2	6	1

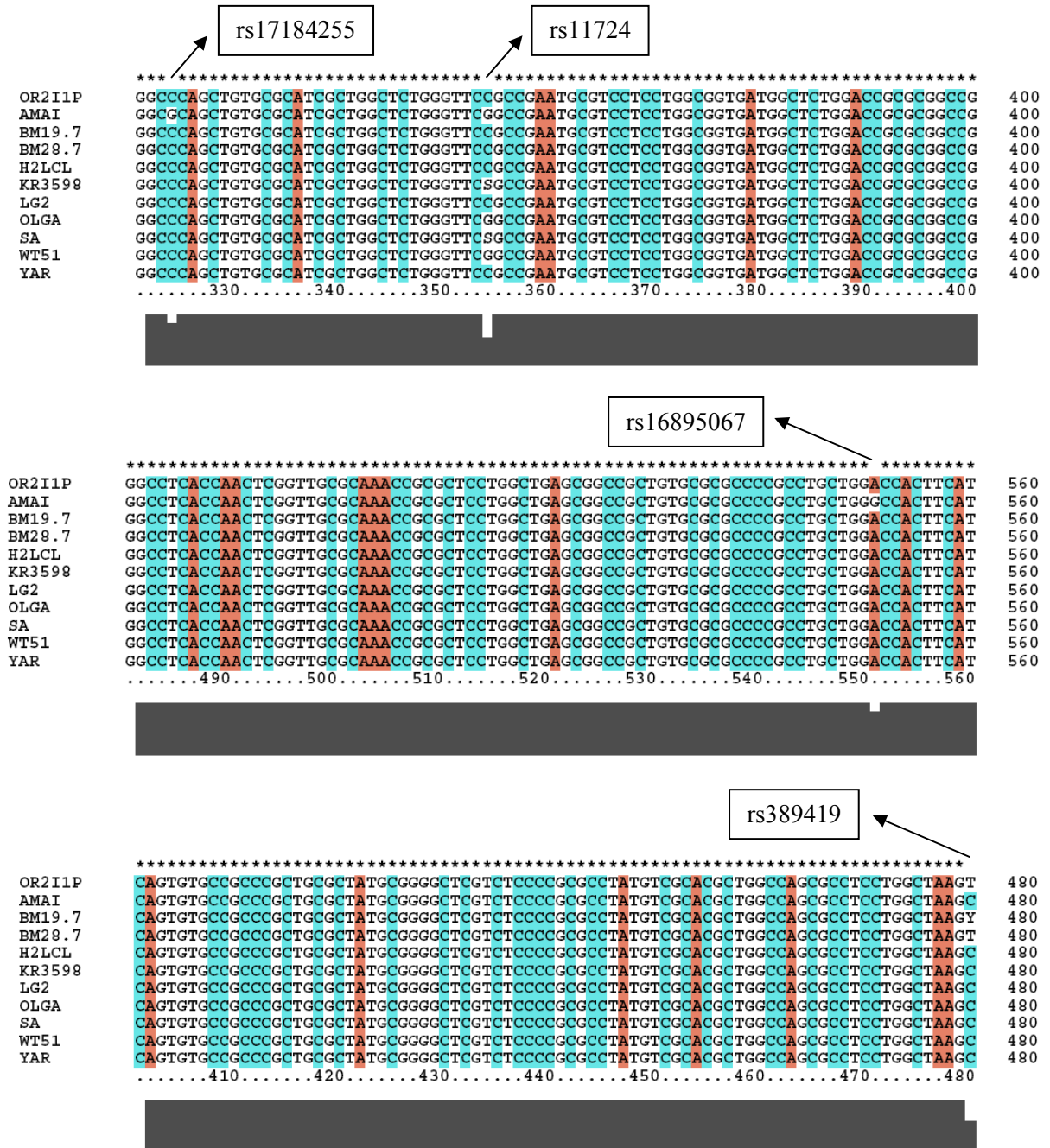
LEGENDA: - Genes *OR* não seqüenciados. Não há distinção entre homozigotos e heterozigotos. Os valores de SNPs apresentados foram obtidos utilizando as seqüências de referência presentes no banco de dados HORDE.

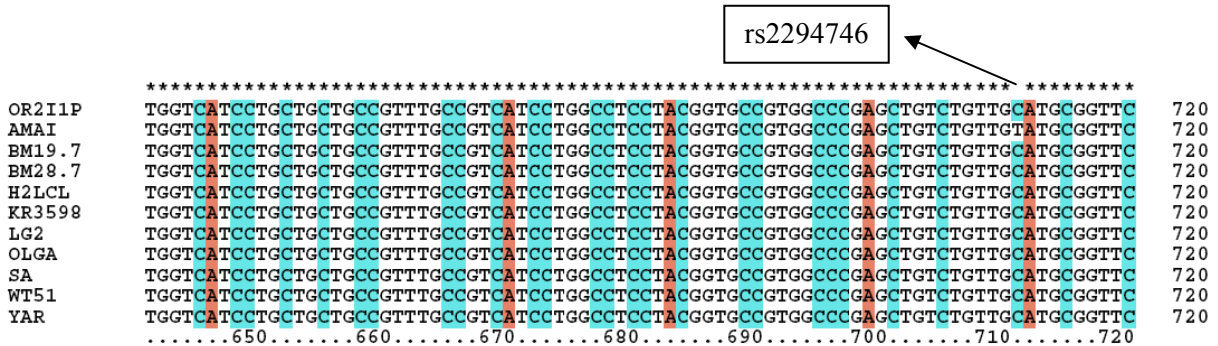
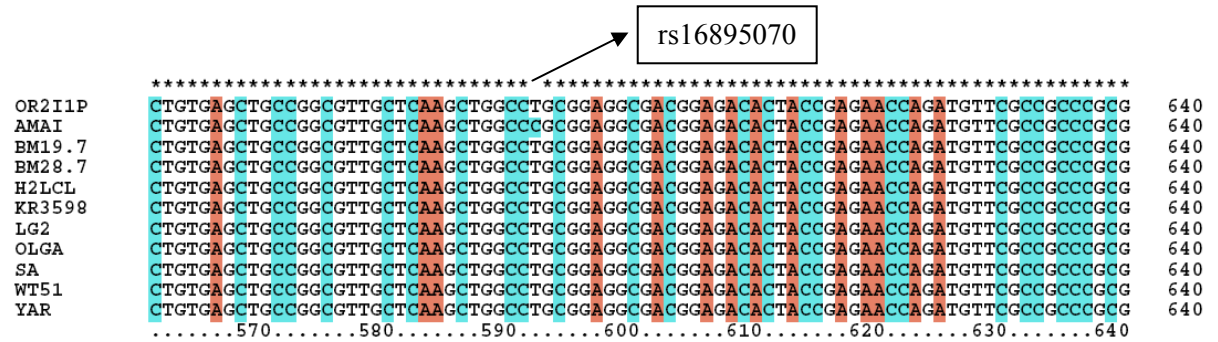
FIGURA 15 – EXEMPLO DE INTERPRETAÇÃO DOS ALINHAMENTOS



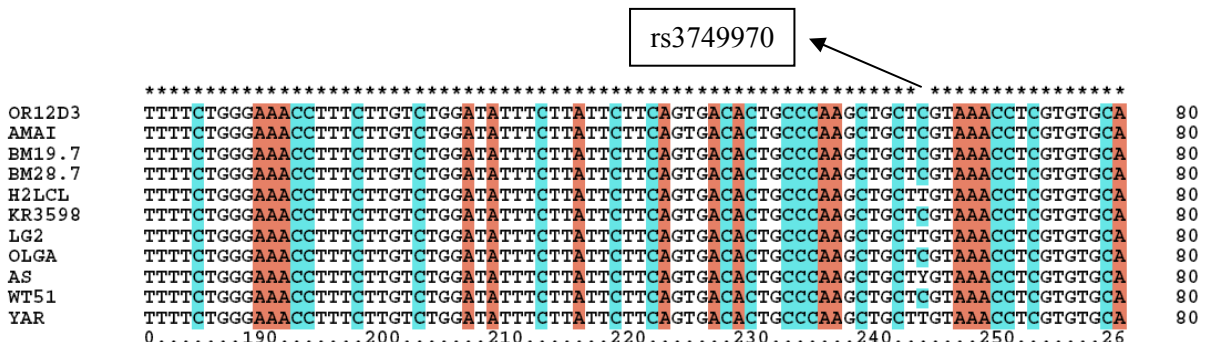
Código do nucleotídeo:	Base:
A.....	Adenina
C.....	Citosina
G.....	Guanina
T.....	Timina
R.....	A ou G
Y.....	C ou T
S.....	G ou C
W.....	A ou T
K.....	G ou T
M.....	A ou C
B.....	C, G ou T
D.....	A, G ou T
H.....	A, C ou T
V.....	A, C ou G
N.....	qualquer base
“.” ou “-“	“gap”

• *OR211P*





- *OR12D3*



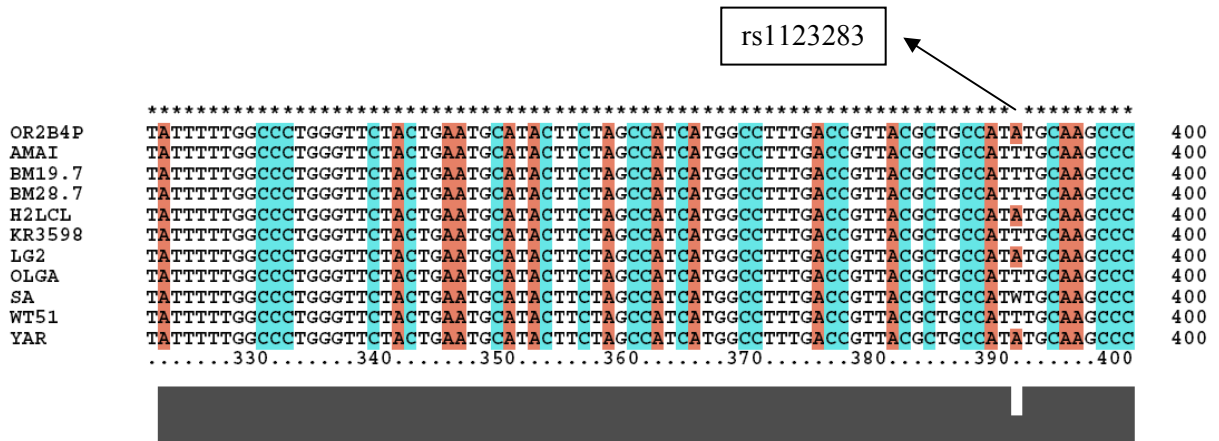
rs9380122

rs9380122

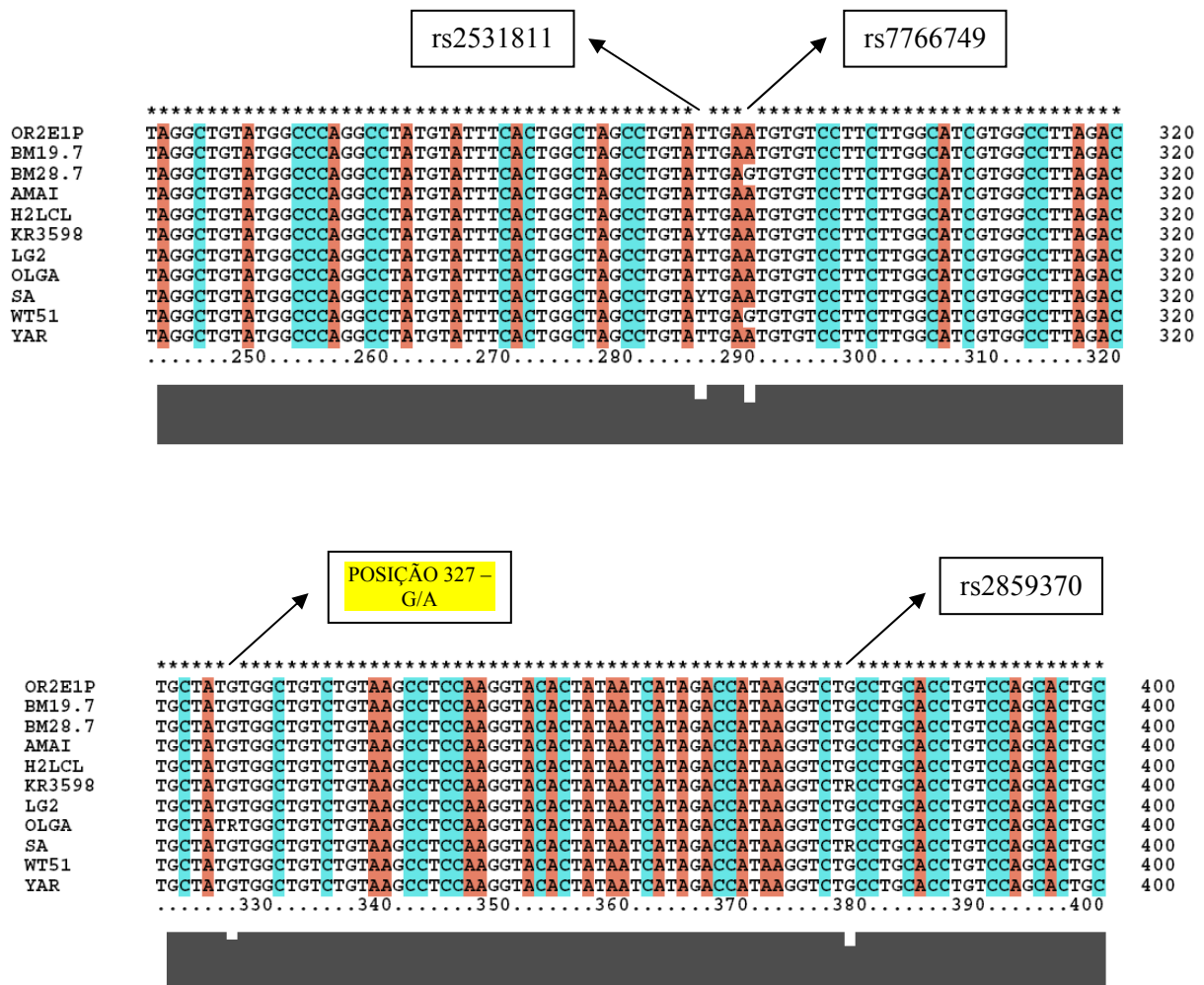
rs9380122

	***** / *****	
OR14J1	ATGGTCAATTTGACTTCAATGAGTGGATTCTTCTTATGGGGTTTTCTGATGAGCGTAAGCTTCAGATTTTACATGCATT	80
AMAI	ATGGTCAATTTGACTTCAACGAGTGGATTCTTCTTATGGGGTTTTCTGATGAGCGTAAGCTTCAGATTTTACATGCATT	80
BM19.7	ATGGTCAATTTGACTTCAATGAGTGGATTCTTCTTATGGGGTTTTCTGATGAGCGTAAGCTTCAGATTTTACATGCATT	80
BM28.7	ATGGTCAATTTGACTTCAATGAGTGGATTCTTCTTATGGGGTTTTCTGATGAGCGTAAGCTTCAGATTTTACATGCATT	80
H2LCL	ATGGTCAATTTGACTTCAACGAGTGGATTCTTCTTATGGGGTTTTCTGATGAGCGTAAGCTTCAGATTTTACATGCATT	80
KR3598	ATGGTCAATTTGACTTCAATGAGTGGATTCTTCTTATGGGGTTTTCTGATGAGCGTAAGCTTCAGATTTTACATGCATT	80
LG2	ATGGTCAATTTGACTTCAACGAGTGGATTCTTCTTATGGGGTTTTCTGATGAGCGTAAGCTTCAGATTTTACATGCATT	80
OLGA	ATGGTCAATTTGACTTCAATGAGTGGATTCTTCTTATGGGGTTTTCTGATGAGCGTAAGCTTCAGATTTTACATGCATT	80
SA	ATGGTCAATTTGACTTCAATGAGTGGATTCTTCTTATGGGGTTTTCTGATGAGCGTAAGCTTCAGATTTTACATGCATT	80
WT51	ATGGTCAATTTGACTTCAATGAGTGGATTCTTCTTATGGGGTTTTCTGATGAGCGTAAGCTTCAGATTTTACATGCATT	80
YAR	ATGGTCAATTTGACTTCAACGAGTGGATTCTTCTTATGGGGTTTTCTGATGAGCGTAAGCTTCAGATTTTACATGCATT	80
	1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80	

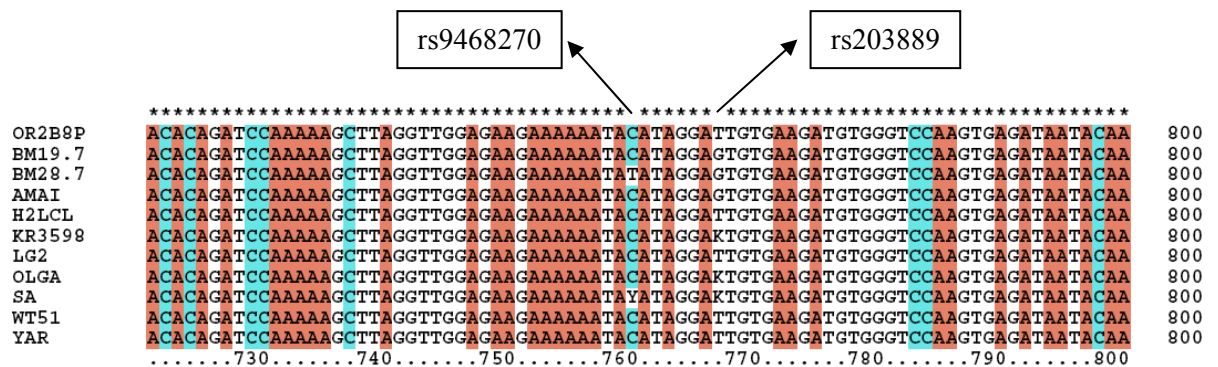
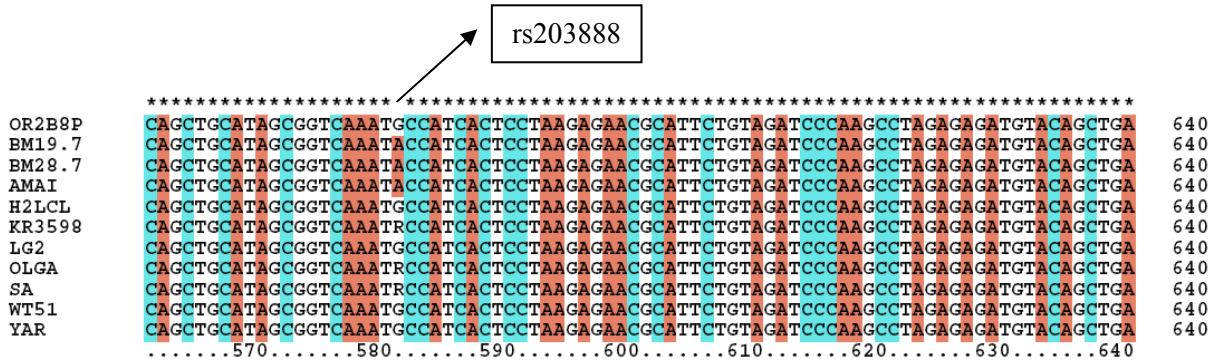
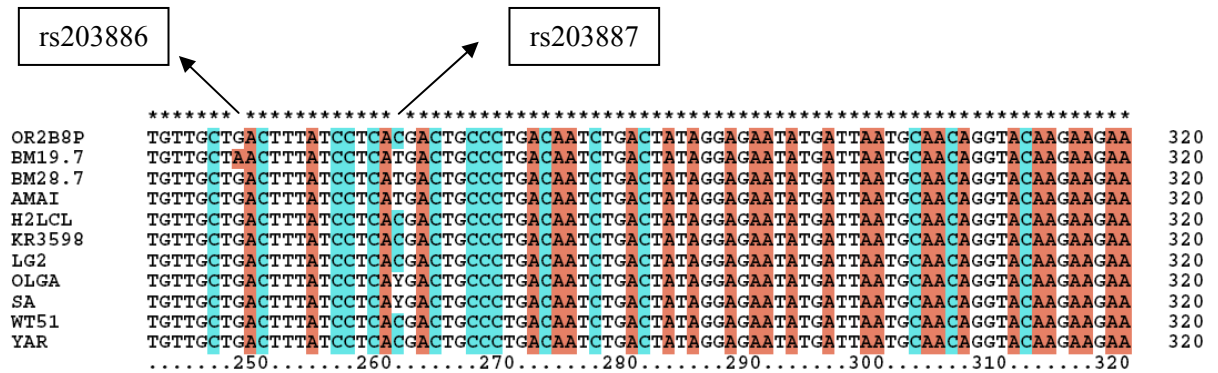
- *OR2B4P*



- *OR2E1P*



• *OR2B8P*



OR2B9P TGATGGTTTGTTCCTCCAGCAAAGTGAAGATATAGAAGATCAAAA-AAACCACAAAGAGGACTAGCTCCAGCTGAGGCCCTG 879

BM19.7 TGATGGTTTGTTCCTCCAGCAAAGTGAAGATATAGAAGATCAAAA-GAACCAAAAGAGGACTAGCTCCAGCTGAGGCCCTG 880

BM28.7 TGATGGTTTGTTCCTCCAGCAAAGTGAAGATATAGAAGATCAAAA-GAACCAAAAGAGGACTAGCTCCAGCTGAGGCCCTG 880

AMAI TGATGGTTTGTTCCTCCAGCAAAGTGAAGATATAGAAGATCAAAA-GAACCAAAAGAGGACTAGCTCCAGCTGAGGCCCTG 880

H2LCL TGATGGTTTGTTCCTCCAGCAAAGTGAAGATATAGAAGATCAAAA-AAACCACAAAGAGGACTAGCTCCAGCTGAGGCCCTG 879

KR3598 TGATGGTTTGTTCCTCCAGCAAAGTGAAGATATAGAAGATCAAAA-AAACCACAAAGAGGACTAGCTCCAGCTGAGGCCCTG 879

LG2 TGATGGTTTGTTCCTCCAGCAAAGTGAAGATATAGAAGATCAAAA-AAACCACAAAGAGGACTAGCTCCAGCTGAGGCCCTG 879

OLGA TGATGGTTTGTTCCTCCAGCAAAGTGAAGATATAGAAGATCAAAA-AAACCACAAAGAGGACTAGCTCCAGCTGAGGCCCTG 879

SA TGATGGTTTGTTCCTCCAGCAAAGTGAAGATATAGAAGATCAAAA-AAACCACAAAGAGGACTAGCTCCAGCTGAGGCCCTG 879

WT51 TGATGGTTTGTTCCTCCAGCAAAGTGAAGATATAGAAGATCAAAA-AAACCACAAAGAGGACTAGCTCCAGCTGAGGCCCTG 879

YAR TGATGGTTTGTTCCTCCAGCAAAGTGAAGATATAGAAGATCAAAA-AAACCACAAAGAGGACTAGCTCCAGCTGAGGCCCTG 879

.....810.....820.....830.....840.....850.....860.....870.....880

POSIÇÃO 845 --/G
As linhagens OLGA, SA e KR3598 são heterozigotas. As linhagens BM19.7, BM28.7 e AMAI são homozigotas para a inserção de "G".

- OR2B7P

OR2B7P CGGGGGGAGTGGAGTGTGTCTTATTGTCTGCCATGGCCTATGACCGCTATGCAGCCGTCTGCCGCCACTCCACTACATG 400

AMAI CGGGGGGAGTGGAGTGTGTCTTATTGTCTGCCATGGCCTATGACCGCTATGCAGCCGTCTGCCGCCACTCCACTACATG 400

BM19.7 CGGGGGGAGTGGAGTGTGTCTTATTGTCTGCCATGGCCTATGACCGCTATGCAGCCGTCTGCCGCCACTCCACTACATG 400

H2LCL CGGGGGGAGTGGAGTGTGTCTTATTGTCTGCCATGGCCTATGACCGCTATGCAGCCGTCTGCCGCCACTCCACTACATG 400

LG2 CGGGGGGAGTGGAGTGTGTCTTATTGTCTGCCATGGCCTATGACCGCTATGCAGCCGTCTGCCGCCACTCCACTACATG 400

WT51 CGGGGGGAGTGGAGTGTGTCTTATTGTCTGCCATGGCCTATGACCGCTATGCAGCCGTCTGCCGCCACTCCACTACATG 400

YAR CGGGGGGAGTGGAGTGTGTCTTATTGTCTGCCATGGCCTATGACCGCTATGCAGCCGTCTGCCGCCACTCCACTACATG 400

.....330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....400

rs149900

OR2B7P CACAGGATGTGAACAAAAGCATTGCACTCTTCTATACTCTGGTGACTCCTCTACTGAATCCCCTAATTTCACTCTGAGG 880

AMAI CACAGGATGTGAACAAAAGCATTGCACTCTTCTATACTCTGGTGACTCCTCTACTGAATCCCCTAATTTCACTCTGAGG 880

BM19.7 CACAGGATGTGAACAAAAGCATTGCACTCTTCTATACTCTGGTGACTCCTCTACTGAATCCCCTAATTTCACTCTGAGG 880

H2LCL CACAGGATGTGAACAAAAGCATTGCACTCTTCTATACTCTGGTGACTCCTCTACTGAATCCCCTAATTTCACTCTGAGG 880

LG2 CACAGGATGTGAACAAAAGCATTGCACTCTTCTATACTCTGGTGACTCCTCTACTGAATCCCCTAATTTCACTCTGAGG 880

WT51 CACAGGATGTGAACAAAAGCATTGCACTCTTCTATACTCTGGTGACTCCTCTACTGAATCCCCTAATTTCACTCTGAGG 880

YAR CACAGGATGTGAACAAAAGCATTGCACTCTTCTATACTCTGGTGACTCCTCTACTGAATCCCCTAATTTCACTCTGAGG 880

.....810.....820.....830.....840.....850.....860.....870.....880

POSIÇÃO 837 - C/T

rs35572414

```

*****
OR2B7P AACAGGAAGTCAAAGGGGCAACTAAGAAGACTAGTGGGAGGACCATAGATGCA 935
AMAI AACAGGAAGTCAAAGGGGCA-CTAAGAAGACTAGTGGGAGGACCATAGATGCA 934
BM19.7 AACAGGAAGTCAAAGGGGCA-CTAAGAAGACTAGTGGGAGGACCATAGATGCA 934
H2LCL AACAGGAAGTCAAAGGGGCAACTAAGAAGACTAGTGGGAGGACCATAGATGCA 935
LG2 AACAGGAAGTCAAAGGGGCAACTAAGAAGACTAGTGGGAGGACCATAGATGCA 935
WT51 AACAGGAAGTCAAAGGGGCAACTAAGAAGACTAGTGGGAGGACCATAGATGCA 935
YAR AACAGGAAGTCAAAGGGGCAACTAAGAAGACTAGTGGGAGGACCATAGATGCA 935
.....890.....900.....910.....920.....930.....

```

OR2W2P

POSIÇÃO 326 – G/A

```

*****
OR2W2P CCTGGGTGGCAAGAGTGTATTCTCTGGCAGCCGTGGCCTATGACCGCTTCATTGCAATCTGCAAGCCCCCTTCACTATTTC 400
AMAI CCTGGGTGGCAAGAGTGTATTCTCTGGCAGCCGTGGCCTATGACCGCTTCATTGCAATCTGCAAGCCCCCTTCACTATTTC 400
BM19.7 CCTGGATGGCAAGAGTGTATTCTCTGGCAGCCGTGGCCTATGACCGCTTCATTGCAATCTGCAAGCCCCCTTCACTATTTC 400
BM28.7 CCTGGGTGGCAAGAGTGTATTCTCTGGCAGCCGTGGCCTATGACCGCTTCATTGCAATCTGCAAGCCCCCTTCACTATTTC 400
H2LCL CCTGGGTGGCAAGAGTGTATTCTCTGGCAGCCGTGGCCTATGACCGCTTCATTGCAATCTGCAAGCCCCCTTCACTATTTC 400
KR3598 CCTGGGTGGCAAGAGTGTATTCTCTGGCAGCCGTGGCCTATGACCGCTTCATTGCAATCTGCAAGCCCCCTTCACTATTTC 400
LG2 CCTGGGTGGCAAGAGTGTATTCTCTGGCAGCCGTGGCCTATGACCGCTTCATTGCAATCTGCAAGCCCCCTTCACTATTTC 400
OLGA CCTGGGTGGCAAGAGTGTATTCTCTGGCAGCCGTGGCCTATGACCGCTTCATTGCAATCTGCAAGCCCCCTTCACTATTTC 400
SA CCTGGGTGGCAAGAGTGTATTCTCTGGCAGCCGTGGCCTATGACCGCTTCATTGCAATCTGCAAGCCCCCTTCACTATTTC 400
WT51 CCTGGGTGGCAAGAGTGTATTCTCTGGCAGCCGTGGCCTATGACCGCTTCATTGCAATCTGCAAGCCCCCTTCACTATTTC 400
YAR CCTGGGTGGCAAGAGTGTATTCTCTGGCAGCCGTGGCCTATGACCGCTTCATTGCAATCTGCAAGCCCCCTTCACTATTTC 400
.....330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....400

```

POSIÇÃO 448 – G/A

```

*****
OR2W2P TGTCAATTATGCAACCTCAGCTGTGCTGGAAGTTGGTGTCTGTGGCCCGGGGGTGTGGACTCCTCAGTTCTCTAGTTATG 480
AMAI TGTCAATTATGCAACCTCAGCTGTGCTGGAAGTTGGTGTCTGTGGCCCGGGGGTGTGGACTCCTCAGTTCTCTAGTTATG 480
BM19.7 TGTCAATTATGCAACCTCAGCTGTGCTGGAAGTTGGTGTCTGTGGCCCGGGGGTGTGGACTCCTCAGTTCTCTAGTTATG 480
BM28.7 TGTCAATTATGCAACCTCAGCTGTGCTGGAAGTTGGTGTCTGTGGCCCGGGGGTGTGGACTCCTCAGTTCTCTAGTTATG 480
H2LCL TGTCAATTATGCAACCTCAGCTGTGCTGGAAGTTGGTGTCTGTGGCCCGGGGGTGTGGACTCCTCAGTTCTCTAGTTATG 480
KR3598 TGTCAATTATGCAACCTCAGCTGTGCTGGAAGTTGGTGTCTGTGGCCCGGGGGTGTGGACTCCTCAGTTCTCTAGTTATG 480
LG2 TGTCAATTATGCAACCTCAGCTGTGCTGGAAGTTGGTGTCTGTGGCCCGGGGGTGTGGACTCCTCAGTTCTCTAGTTATG 480
OLGA TGTCAATTATGCAACCTCAGCTGTGCTGGAAGTTGGTGTCTGTGGCCCGGGGGTGTGGACTCCTCAGTTCTCTAGTTATG 480
SA TGTCAATTATGCAACCTCAGCTGTGCTGGAAGTTGGTGTCTGTGGCCCGGGGGTGTGGACTCCTCAGTTCTCTAGTTATG 480
WT51 TGTCAATTATGCAACCTCAGCTGTGCTGGAAGTTGGTGTCTGTGGCCCGGGGGTGTGGACTCCTCAGTTCTCTAGTTATG 480
YAR TGTCAATTATGCAACCTCAGCTGTGCTGGAAGTTGGTGTCTGTGGCCCGGGGGTGTGGACTCCTCAGTTCTCTAGTTATG 480
.....410.....420.....430.....440.....450.....460.....470.....480

```

 OR2W2P TTAATCCTCATCTCTTATAGCTACATTGCCCTAGCAGTGTGAGAAATCAAGTCAGCCGCAGGAAAGAAAGGCCTTCAAT 720
 AMAI TTAATCCTCATCTCTTATAGCTACATTGCCCTAGCAGTGTGAGAAATCAAGTCAGCCGCAGGAAAGAAAGGCCTTCAAT 720
 BM19.7 TTAATCCTCATCTCTTATAGCTACATTGCCCTAGCAGTGTGAGAAATCAAGTCAGCCGCAGGAAAGAAAGGCCTTCAAT 720
 BM28.7 TTAATCCTCATCTCTTATAGCTACATTGCCCTAGCAGTGTGAGAAATCAAGTCAGCCGCAGGAAAGAAAGGCCTTCAAT 720
 H2LCL TTAATCCTCATCTCTTATAGCTACATTGCCCTAGCAGTGTGAGAAATCAAGTCAGCCGCAGGAAAGAAAGGCCTTCAAT 720
 KR3598 TTAATCCTCATCTCTTATAGCTACATTGCCCTAGCAGTGTGAGAAATCAAGTCAGCCGCAGGAAAGAAAGGCCTTCAAT 720
 LG2 TTAATCCTCATCTCTTATAGCTACATTGCCCTAGCAGTGTGAGAAATCAAGTCAGCCGCAGGAAAGAAAGGCCTTCAAT 720
 OLGA TTAATCCTCATCTCTTATAGCTACATTGCCCTAGCAGTGTGAGAAATCAAGTCAGCCGCAGGAAAGAAAGGCCTTCAAT 720
 SA TTAATCCTCATCTCTTATAGCTACATTGCCCTAGCAGTGTGAGAAATCAAGTCAGCCGCAGGAAAGAAAGGCCTTCAAT 720
 WT51 TTAATCCTCATCTCTTATAGCTACATTGCCCTAGCAGTGTGAGAAATCAAGTCAGCCGCAGGAAAGAAAGGCCTTCAAT 720
 YAR TTAATCCTCATCTCTTATAGCTACATTGCCCTAGCAGTGTGAGAAATCAAGTCAGCCGCAGGAAAGAAAGGCCTTCAAT 720
650.....660.....670.....680.....690.....700.....710.....720

rs149943

- OR2W4P

 OR2W4P CTGGCAAACTCTTCTCTAGATCTCTGCTTCAGTACTAGTTGCATCCCAAAATGCTGGTAAACCTCTGGGGCCCTGA 240
 AMAI CTGGCAAACTCTTCTCTAGATCTCTGCTTCAGTACTAGTTGCATCCCAAAATGCTGGTAAACCTCTGGGGCCCTGA 240
 BM19.7 CTGGCAAACTCTTCTCTAGATCTCTGCTTCAGTACTAGTTGCATCCCAAAATGCTGGTAAACCTCTGGGGCCCTGA 240
 BM28.7 CTGGCAAACTCTTCTCTAGATCTCTGCTTCAGTACTAGTTGCATCCCAAAATGCTGGTAAACCTCTGGGGCCCTGA 240
 H2LCL CTGGCAAACTCTTCTCTAGATCTCTGCTTCAGTACTAGTTGCATCCCAAAATGCTGGTAAACCTCTGGGGCCCTGA 240
 KR3598 CTGGCAAACTCTTCTCTAGATCTCTGCTTCAGTACTAGTTGCATCCCAAAATGCTGGTAAACCTCTGGGGCCCTGA 240
 LG2 CTGGCAAACTCTTCTCTAGATCTCTGCTTCAGTACTAGTTGCATCCCAAAATGCTGGTAAACCTCTGGGGCCCTGA 240
 OLGA CTGGCAAACTCTTCTCTAGATCTCTGCTTCAGTACTAGTTGCATCCCAAAATGCTGGTAAACCTCTGGGGCCCTGA 240
 SA CTGGCAAACTCTTCTCTAGATCTCTGCTTCAGTACTAGTTGCATCCCAAAATGCTGGTAAACCTCTGGGGCCCTGA 240
 WT51 CTGGCAAACTCTTCTCTAGATCTCTGCTTCAGTACTAGTTGCATCCCAAAATGCTGGTAAACCTCTGGGGCCCTGA 240
 YAR CTGGCAAACTCTTCTCTAGATCTCTGCTTCAGTACTAGTTGCATCCCAAAATGCTGGTAAACCTCTGGGGCCCTGA 240
 .190.....200.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....

rs12524914

POSIÇÃO 713 –
C/T

 OR2W4P CAGCTGTGCTAAGCATCAAGTCAGCTGCCAGGCAATGGAAGGCCTTCCATACCTGTAGCTCTCACCTCACAGTGGTCTCC 720
 AMAI CAGCTGTGCTAAGCATCAAGTCAGCTGCCAGGCAATGGAAGGCCTTCCATACCTGTAGCTCTCACCTCACAGTGGTCTCC 720
 BM19.7 CAGCTGTGCTAAGCATCAAGTCAGCTGCCAGGCAATGGAAGGCCTTCCATACCTGTAGCTCTCACCTCACAGTGGTCTCC 720
 BM28.7 CAGCTGTGCTAAGCATCAAGTCAGCTGCCAGGCAATGGAAGGCCTTCCATACCTGTAGCTCTCACCTCACAGTGGTCTCC 720
 H2LCL CAGCTGTGCTAAGCATCAAGTCAGCTGCCAGGCAATGGAAGGCCTTCCATACCTGTAGCTCTCACCTCACAGTGGTCTCC 720
 KR3598 CAGCTGTGCTAAGCATCAAGTCAGCTGCCAGGCAATGGAAGGCCTTCCATACCTGTAGCTCTCACCTCACAGTGGTCTCC 720
 LG2 CAGCTGTGCTAAGCATCAAGTCAGCTGCCAGGCAATGGAAGGCCTTCCATACCTGTAGCTCTCACCTCACAGTGGTCTCC 720
 OLGA CAGCTGTGCTAAGCATCAAGTCAGCTGCCAGGCAATGGAAGGCCTTCCATACCTGTAGCTCTCACCTCACAGTGGTCTCC 720
 SA CAGCTGTGCTAAGCATCAAGTCAGCTGCCAGGCAATGGAAGGCCTTCCATACCTGTAGCTCTCACCTCACAGTGGTCTCC 720
 WT51 CAGCTGTGCTAAGCATCAAGTCAGCTGCCAGGCAATGGAAGGCCTTCCATACCTGTAGCTCTCACCTCACAGTGGTCTCC 720
 YAR CAGCTGTGCTAAGCATCAAGTCAGCTGCCAGGCAATGGAAGGCCTTCCATACCTGTAGCTCTCACCTCACAGTGGTCTCC 720
 .670.....680.....690.....700.....710.....720.....730.....740.....

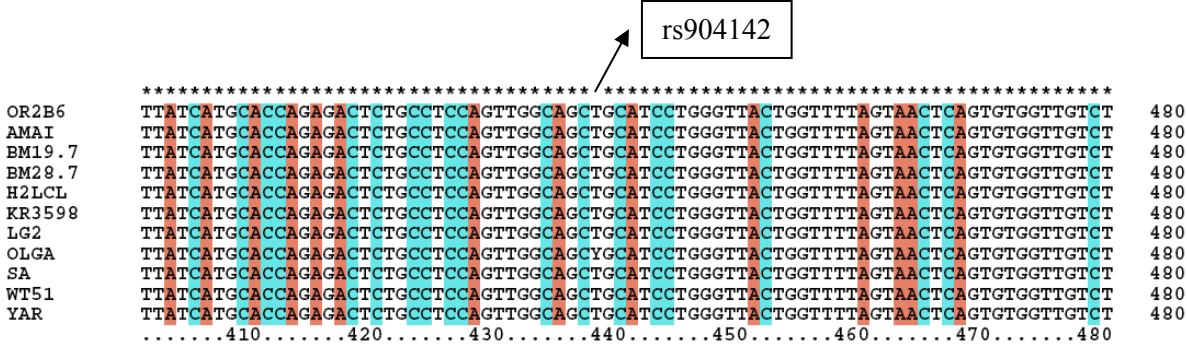
		rs11752815	
*****	*****		
OR2W4P	CTGTTTTATGGGAGCATCATCTATATGTATATGCAGCCAGGAAACAGTTCTTCCCAAGACCAAGGCAA	GTTTCTCACTCT	800
AMAI	CTGTTTTATGGGAGCATCATCTATATGTATATGCAGCCAGGAAACAGTTCTTCCCAAGACCAAGGCAA	GTTTCTCACTCT	800
BM19.7	CTGTTTTATGGGAGCATCATCTATATGTATATGCAGCCAGGAAACAGTTCTTCCCAAGACCAAGGCAA	GTTTCTCACTCT	800
BM28.7	CTGTTTTATGGGAGCATCATCTATATGTATATGCAGCCAGGAAACAGTTCTTCCCAAGACCAAGGCAA	GTTTCTCACTCT	800
H2LCL	CTGTTTTATGGGAGCATCATCTATATGTATATGCAGCCAGGAAACAGTTCTTCCCAAGACCAAGGCAA	GTTTCTCACTCT	800
KR3598	CTGTTTTATGGGAGCATCATCTATATGTATATGCAGCCAGGAAACAGTTCTTCCCAAGACCAAGGCAA	GTTTCTCACTCT	800
LG2	CTGTTTTATGGGAGCATCATCTATATGTATATGCAGCCAGGAAACAGTTCTTCCCAAGACCAAGGCAA	GTTTCTCACTCT	800
OLGA	CTGTTTTATGGGAGCATCATCTATATGTATATGCAGCCAGGAAACAGTTCTTCCCAAGACCAAGGCAA	GTTTCTCACTCT	800
SA	CTGTTTTATGGGAGCATCATCTATATGTATATGCAGCCAGGAAACAGTTCTTCCCAAGACCAAGGCAA	GTTTCTCACTCT	800
WT51	CTGTTTTATGGGAGCATCATCTATATGTATATGCAGCCAGGAAACAGTTCTTCCCAAGACCAAGGCAA	GTTTCTCACTCT	800
YAR	CTGTTTTATGGGAGCATCATCTATATGTATATGCAGCCAGGAAACAGTTCTTCCCAAGACCAAGGCAA	GTTTCTCACTCT	800
	.750.....760.....770.....780.....790.....800.....810.....820.....		

		POSIÇÃO 908 – G/C		POSIÇÃO 916 – G/A	
*****	*****				
OR2W4P	AGGTTTTGGGGAGGCAA	897			
AMAI	ACGTTTTGGGGAGGCAA	897			
BM19.7	AGGTTTTGGGGAGGCAA	897			
BM28.7	AGGTTTTGGGGAGGCAA	897			
H2LCL	AGGTTTTGGGGAGGCAA	897			
KR3598	AGGTTTTGGRGAGGCAA	897			
LG2	AGGTTTTGGGGAGGCAA	897			
OLGA	AGGTTTTGGGGAGGCAA	897			
SA	AGGTTTTGGGGAGGCAA	897			
WT51	AGGTTTTGGGGAGGCAA	897			
YAR	AGGTTTTGGGGAGGCAA	897			
	.910.....920...				

- OR2B6

rs7767176

OR2B6	GGGGGCTACTGAATATCTTCTCCTGGCCGTCATGTCTTTGATAGGTTTGTAGCTATTGTGCGCCCTCTCCATTACTCAG	400
AMAI	GGGGGCTACTGAATATCTTCTCCTGGCCGTCATGTCTTTGATAGGTTTGTAGCTATTGTGCGCCCTCTCCATTACTCAG	400
BM19.7	GGGGGCTACTGAATATCTTCTCCTGGCCGTCATGTCTTTGATAGGTTTGTAGCTATTGTGCGCCCTCTCCATTACTCAG	400
BM28.7	GGGGGCTACTGAATATCTTCTCCTGGCCGTCATGTCTTTGATAGGTTTGTAGCTATTGTGCGCCCTCTCCATTACTCAG	400
H2LCL	GGGGGCTACTGAATATCTTCTCCTGGCCGTCATGTCTTTGATAGGTTTGTAGCTATTGTGCGCCCTCTCCATTACTCAG	400
KR3598	GGGGGCTACTGAATATCTTCTCCTGGCCGTCATGTCTTTGATAGGTTTGTAGCTATTGTGCGCCCTCTCCATTACTCAG	400
LG2	GGGGGCTACTGAATATCTTCTCCTGGCCGTCATGTCTTTGATAGGTTTGTAGCTATTGTGCGCCCTCTCCATTACTCAG	400
OLGA	GGGGGCTACTGAATATCTTCTCCTGGCCGTCATGTCTTTGATAGGTTTGTAGCTATTGTGCGCCCTCTCCATTACTCAG	400
SA	GGGGGCTACTGAATATCTTCTCCTGGCCGTCATGTCTTTGATAGGTTTGTAGCTATTGTGCGCCCTCTCCATTACTCAG	400
WT51	GGGGGCTACTGAATATCTTCTCCTGGCCGTCATGTCTTTGATAGGTTTGTAGCTATTGTGCGCCCTCTCCATTACTCAG	400
YAR	GGGGGCTACTGAATATCTTCTCCTGGCCGTCATGTCTTTGATAGGTTTGTAGCTATTGTGCGCCCTCTCCATTACTCAG	400
330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....400	



6.3. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DO PRESENTE ESTUDO COM OS DE EHLERS *et al.* (2000)

Os dados de seqüenciamento obtidos na presente investigação foram comparados aos dados publicados por EHLERS *et al.* (2000) para obter a caracterização de todos os locos gênicos descritos para os receptores olfatórios presentes no MHC estendido. O número de alelos caracterizados em cada um dos genes *OR* foi semelhante àqueles descritos por EHLERS *et al.* (2000), que observaram uma variação média entre 2 a 7 alelos ao longo das seqüências dos genes *OR*, enquanto no presente estudo observamos uma variação média entre 1 a 6 alelos. Não foram encontradas características distintas das encontradas por EHLERS *et al.* (2000).

TABELA 13 – NÚMERO DE ALELOS NOS GENES *OR* SEQUENCIADOS POR EHLERS *et al.* (2000)

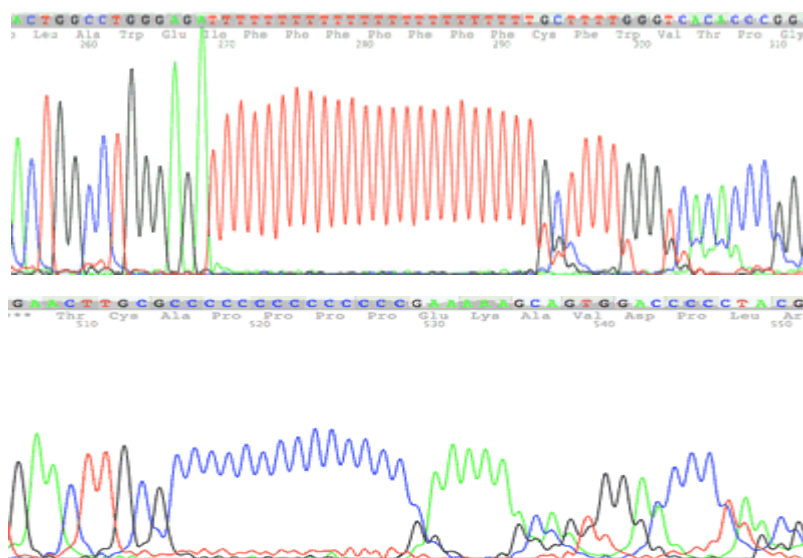
LINHAGENS CELULARES	GENES <i>OR</i>													HAPLÓTIPOS <i>OR</i>
	<i>OR2B2</i>	<i>OR2W1</i>	<i>OR2B3</i>	<i>OR2J1</i>	<i>OR2J3</i>	<i>OR2J2</i>	<i>OR5V1</i>	<i>OR12D2</i>	<i>OR12D1P</i>	<i>OR11A1</i>	<i>OR10C1</i>	<i>OR2H1</i>	<i>OR2H2</i>	
H2LCL	*01	*01	*01	*01	*01	*01	*01	*03	*02	*01	*02	*01	*03	1
YAR	*01	*01	*01	*01	*01	*01	*01	*03	*02	*01	*02	*01	*03	1
LG2	*01	*01	*01	*01	*01	*01	*01	*01	*01	*01	*01	*01	*03	2
OLGA-1	*01	*01	*01	*01	*01	*01	*01	*05	*01	*01	*03	*01	*01	3
OLGA-2	*01	*01	*01	*02	*02	*02	*03	*07	*01	*01	*03	*01	*04	4
SA-1	*01	*01	*01	*01	*01	*01	*02	*05	*02	*01	*02	*01	*03	5
SA-2	*01	*01	*01	*01	*02	*02	*02	*06	*01	*01	*02	*01	*02	6
BM28.7	*01	*01	*01	*05	*02	*02	*01	*01	*01	*01	*01	*02	*01	7
BM19.7	*01	*01	*02	*05	*02	*02	*01	*03	*02	*01	*05	*03	*02	8
WT51-1	*01	*02	*01	*03	*03	*03	*01	*02	*01	*01	*02	*01	*01	9
WT51-2	*01	*02	*01	*03	*03	*03	*01	*02	*01	*01	*02	*01	*04	10
KR3598-1	*02	*01	*01	*01	*02	*01	*01	*03	*02	*02	*03	*01	*02	11
KR3598-2	*02	*01	*01	*02	*02	*02	*01	*04	*01	*02	*03	*01	*03	12
AMAI	*01	*03	*01	*04	*04	*02	*04	*01	*01	*01	*04	*03	*01	13
NÚMERO DE ALELOS	2	3	2	5	4	3	4	7	2	2	5	3	4	

FONTE: Adaptado de: EHLERS, A.; BECK, S.; FORBES, S. A.; TROWSDALE, A. V.; YOUNGER, R.; ZIEGLER, A. MHC-linked olfactory receptor loci exhibit polymorphism and contribute to extended HLA/OR-haplotypes. **Genome Research**, New York, v.10, n.12, p.1968-1978, 2000.

7. DISCUSSÃO

A técnica de seqüenciamento empregada permitiu seqüenciar 11 genes *OR* dos 12 pretendidos. O gene *OR1F12* não foi seqüenciado por apresentar problemas no delineamento do iniciador OR1F12L. Após ser realizada a reação de seqüenciamento, o cromatograma apresentou características condizentes com o deslizamento (*slippage*) da enzima DNA polimerase (Figuras 16 e 17). Durante a adição de nucleotídeos complementares numa região que apresenta muitas repetições de um único nucleotídeo (por exemplo: repetições GGGGGGGGn...) a DNA polimerase perde o foco e resolução da complementariedade, o que se reflete em picos aleatórios no cromatograma. A nossa proposta para a resolução dessa dificuldade técnica em estudos futuros é o desenvolvimento de um novo oligonucleotídeo iniciador cujo seqüência alvo seja posterior essas regiões de repetições.

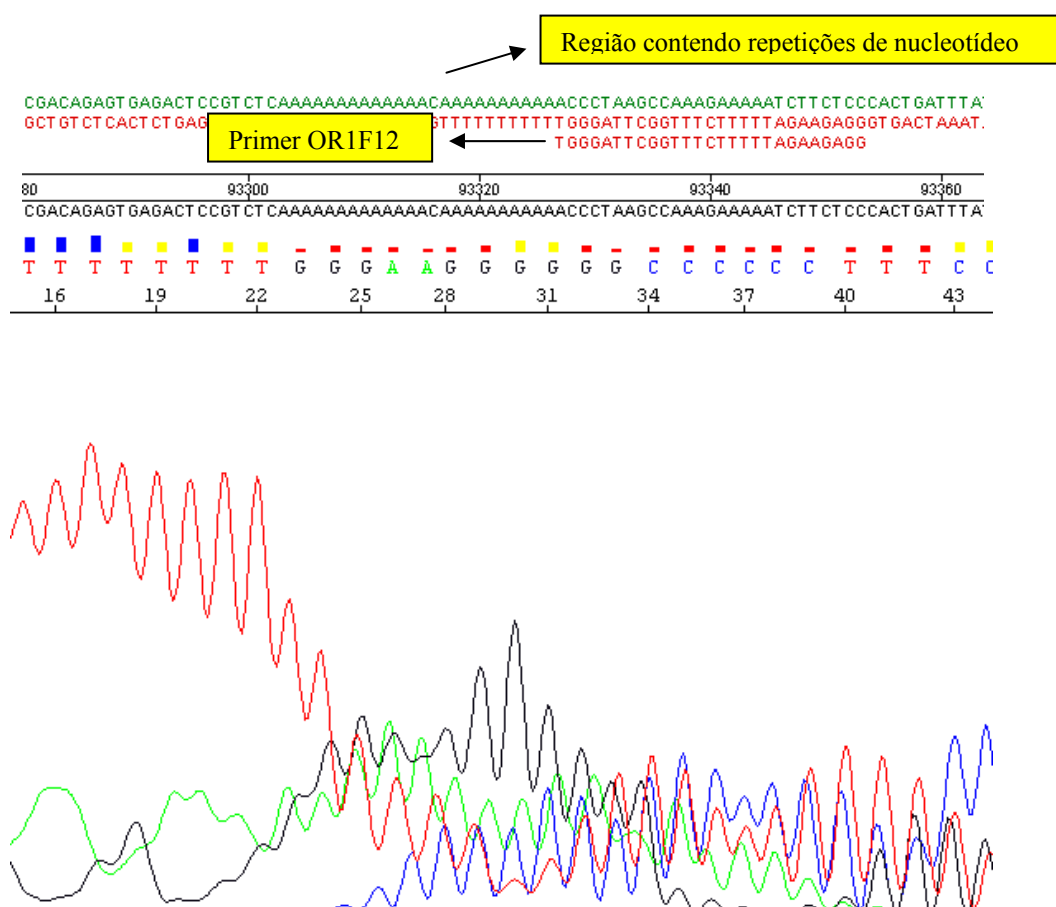
FIGURA 16 – EXEMPLOS DE *SLIPPAGE* DA DNA POLIMERASE



FONTE: NUCLEICS. **Mononucleotide or AT Run Slippage**. Disponível em: <http://www.nucleics.com/DNA_sequencing_support/DNA-sequencing-AT-slippage.html> Acesso em: 03 jun. 2008.

NOTA: A parte superior da ilustração representa o problema de *slippage* da polimerase devido ao grande número de repetições do nucleotídeo timina. A parte inferior representa o mesmo problema devido a repetições de citosina. Após o fim das repetições, os eletroferogramas apresentam vários picos de diferentes nucleotídeos para uma mesma posição, impossibilitando a análise nesse ponto.

FIGURA 17 – *SLIPPAGE* DA DNA POLIMERASE OCORRIDO NA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DO GENE *OR1F12*



NOTA: A parte superior da ilustração apresenta o iniciador (OR1F12L) e seu local de anelamento. A parte inferior, representa o cromatograma obtido utilizando-se o oligonucleotídeo citado.

Como observado na Tabela 11, 4 dos 11 genes *OR* seqüenciados não apresentaram resultados completos no que se refere à extensão do segmento gênico analisado (número de nucleotídeos que compõem as seqüências de referência - HORDE). Esse fato é explicável pelo protocolo utilizar apenas um par de iniciadores e não com a técnica de seqüenciamento em si. Para os próximos estudos sugerimos a utilização de 2 pares de iniciadores quando o gene *OR* apresentar mais de 950 nucleotídeos em sua seqüência.

A técnica de seqüenciamento vem se afirmando como uma das melhores técnicas para caracterização de SNPs. No presente estudo nos permitiu caracterizar 9 SNPs novos, ainda não descritos nos banco de dados do NCBI e HORDE.

8. CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu chegar às seguintes conclusões:

- Apesar de seu alto custo, a técnica de seqüenciamento mostrou-se adequada e eficiente para caracterização simultânea de SNPs presentes ao longo de uma seqüência gênica, diferente de técnicas, como *PCR SSP*, que focam em SNPs pontuais. Dessa forma, o seqüenciamento permite um maior detalhamento da estrutura gênica;
- No presente estudo caracterizamos nove (9) SNPs ainda não descritos na literatura;
- A confirmação de mutação de base em indivíduos heterozigotos deve ser analisada por técnicas de clonagem e posterior seqüenciamento;
- Para o seqüenciamento de regiões gênicas que ultrapassem 950pb devem ser utilizados dois pares de iniciadores ao invés de um (1);
- O número de alelos caracterizados em cada um dos genes *OR* foram semelhantes àqueles descritos por EHLERS *et al.* (2000), que observaram uma variação média entre 2 a 7 alelos ao longo das seqüências dos genes *OR*, enquanto no presente estudo observamos uma variação média entre 1 a 6 alelos;
- Antes de iniciar estudos populacionais relacionados aos genes *OR* é desejável que se faça uma caracterização dos genes HLA em alta resolução das 10 linhagens celulares, bem como, a clonagem das linhagens celulares com evidências de heterozigosidade e com isso poderemos definir alelos, haplótipos e desequilíbrio de ligação com maior segurança entre HLA e genes *OR*.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. O Complexo Principal de Histocompatibilidade. In: **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p.65-81.

ANTHONY NOLAN RESEARCH INSTITUTE. **HLA Informatics Group**. Disponível em: <<http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/index.html>>. Acesso em: 03 jun. 08.

APANIUS, V.; PENN, D.; SLEV, P.; RUFF, L. R.; POTTS, W. K.; The nature of selection on the major histocompatibility complex. **Critical Reviews in Immunology**, New York, v.17, p.179-224, 1997.

BALDWIN, J. M. The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. **The EMBO Journal**, Oxford, v.12, n.4, p.1693-1703, 1993.

BARTOSHUK, L. M.; BEAUCHAMP, G. K. Chemical senses. **Annual Review of Psychology**, Palo Alto, v.45, p.419-449, 1994.

BERGEN, A. W.; KORCZAK, J. F.; WEISSBECKER, K. A.; GOLDSTEIN, A. M. A genome-wide search for loci contributing to smoking and alcoholism. **Genetic Epidemiology**, New York, v.17, n.1, p.S55-60, 1999.

BOCKAERT, J.; PIN, J. P. Molecular tinkering of g-protein-coupled receptors: an evolutionary success. **The EMBO Journal**, Oxford, v.18, n.7, p.1723-1729, 1999.

BROWN, J. L. A Theory of Mate Choice Based on Heterozygosity. **Behavioral Ecology**, New York, v.8, p.60-65, 1997.

BROWN, R. What is the role of the immune system in determining individually distinct body odours? **International Journal of Immunopharmacology**, v.17, n.8, p.655-661, 1995.

BROWN, R. E.; MACDONALD, D. W. **Social odors in mammals**. 1.ed. Oxford: Oxford University Press, 1985.

BUCK, L.; AXEL, R. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. **Cell**, Cambridge, v.65, n.1, p.175-187, 1991.
 CAMPBELL, R. D.; TROWSDALE, J. Map of the human MHC. **Immunology Today**, Amsterdam, v.14, n.7, p.349-352, 1993.

CARRINGTON, M.; NELSON, G. W.; MARTIN, M. P.; KISSNER, T.; VLAHOV, D.; GOEDERT, J. J.; KASLOW, R.; BUCHBINDER, S.; HOOTS, K.; O'BRIEN, S. J. HLA and HIV-1: heterozygote advantage and *B*35-Cw*04* disadvantage. **Science**, Washington, v.283, p.1748-1752, 1999.

EHLERS, A.; BECK, S.; FORBES, S. A.; TROWSDALE, A. V.; YOUNGER, R.; ZIEGLER, A. MHC-linked olfactory receptor loci exhibit polymorphism and contribute to extended HLA/OR-haplotypes. **Genome Research**, New York, v.10, p.1968-1978, 2000.

FAN, W.; LIU, Y.; PARIMOO, S.; WEISSMAN, S. M. Olfactory receptor-like genes are located in the human major histocompatibility complex. **Genomics**, San Diego, v.27, n.1, p.119-123, 1995.

FRINGS, S. **Infoseite Zoophysiologie**. Disponível em: <<http://www.sinnesphysiologie.de/olf/olf02al.jpg>>. Acesso em: 16/09/06.

FÜST, G.; ARASON, G.; KRAMER, J.; SZALAI, C.; DUBA, J.; YANG, Y.; CHUNG, E. K.; ZHOU, B.; BLANCHONG, C. A.; LOKKI, M. L.; BÖDVARSSON, S.; PROHÁSZKA, Z.; KARÁDI, I.; VATAY, A.; KOVÁCS, M.; ROMICS, L.; THORGEIRSSON, G.; YU, C. Y. Genetic basis of tobacco smoking: strong association of a specific major histocompatibility complex haplotype on chromosome 6 with smoking behavior. **International Immunology**, Oxford, v.16, n.10, p.1507-1514, 2004.

GERAGHTY, D. E.; KOLLER, B. H.; HANSEN, J. A.; ORR, H. T. The HLA class I gene family includes at least six genes and twelve pseudogenes and gene fragments. **Journal of Immunology**, Bethesda, v.149, p.1934-1946, 1992.

GILAD, Y.; WIEBE, V.; PRZEWORSKI, M.; LANCET, D.; PÄÄBO, S. Loss of olfactory receptor genes coincides with the acquisition of full trichromatic vision in primates. **PLoS biology**, San Francisco, v.2, n.1, p.120-125, 2004.

GLUSMAN, G.; BAHAR, A.; SHARON, D.; PILPEL, Y.; WHITE, J.; LANCET, D. The olfactory receptor gene superfamily: data mining, classification, and nomenclature. **Mammalian Genome**, New York, v.11, p.1016-1023, 2000.

GLUSMAN, G.; CLIFTON, S.; ROE, R.; LANCET, D. Sequence analysis in the olfactory receptor gene cluster on human chromosome 17: recombinatorial events affecting receptor diversity. **Genomics**, San Diego, p.147-160, 1996.

HALLING-BROWN, M. D. **Computational Techniques for the Prediction of Minor Histocompatibility and T cell Antigens**. Disponível em: <http://igrid-ext.cryst.bbk.ac.uk/WWW/PhD_thesis.htm>. Acesso em: 03 jun. 2008.

HORTON, R.; WILMING, L.; RAND, V.; LOVERING, R. C.; BRUFORD, E. A.; KHODIYAR, V. K.; LUSH, M.J.; POVEY, S.; TALBOT, C.C. JR.; WRIGHT, M.; WAIN, H. M.; TROWSDALE, J.; ZIEGLER, A.; BECK, S. Gene map of the extended human MHC. **Nature Reviews Genetics**, London, v.5, n.12, p.889-899, 2004.

HOWARD, J. C. H-2 and mating preferences. **Nature**, London, v. 266, p.406-408, 1977.

JACOB, S.; MCCLINTOCK, M. K.; ZELANO, B.; OBER, C. Paternally inherited HLA alleles are associated with women's choice of male odor. **Nature genetics**, New York, v.30, n.2, p.175-179, 2002.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SCHLOMCHIK, M. **O sistema imune na saúde e na doença**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. Trad. de Cristina Bonorino *et al.*

KAJIYA, K.; INAKI, K.; TANAKA, M.; HAGA, T.; KATAOKA, H.; TOUHARA, K. Molecular bases of odor discrimination: reconstitution of olfactory receptors that recognize overlapping sets of odorants. **The Journal of Neuroscience**, Baltimore, v.21, n.16, p.6018-6025, 2001.

KLEIN, J.; SATO, A. The HLA system. First of two parts. Advances in immunology. **New England Journal of Medicine**, Boston, v.343, n.10, p.702-709, 2000a.

KLEIN, J.; SATO, A. The HLA system. Second of two parts. Advances in immunology. **New England Journal of Medicine**, Boston, v.343, n.11, p.782-786, 2000b.

LECHLER, R.; WARRENS, A. **HLA in Health and Disease**. 2 ed. London: Academic press, 2000. p.472.

MALNIC, B.; GODFREY, P. A.; BUCK, L. B. The human olfactory receptor gene family. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, v.101, n.8, p.2584-2589, 2004.

MALNIC, B.; HIRONO, J.; SATO, T.; BUCK, L. B. Combinatorial receptor codes for odors. **Cell**, Cambridge, v.96, n.5, p.713-723, 1999.

MATSUZAKA, Y.; MAKINO, S.; NAKAJIMA, K.; TOMIZAWA, M.; OKA, A.; BAHRAM, S.; KULSI, J. K.; TAMIYA, G.; INOKO, H. New polymorphic microsatellite markers in the human MHC class III region. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v.57, n.5, p.397-404, 2001.

McCLINTOCK, M. K. Menstrual synchrony and suppression. **Nature**, London, v.229, n.5282, p.244-245, 1971.

MEAGHER, S. Genetic Diversity and *Capillaria hepatica* (Nematoda) Prevalance in Michigan Deer Mouse Populations. **Evolution**, Lawrence, v.53, n.4, p.1318-1324, 1999.

MENGARELLI, R. R. **MHC E OLFATO**. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná. Orientador: Maria da Graça Bicalho, 2005.

MOMBAERTS, P.; WANG, F.; DULAC, C.; CHAO, S.; NEMES, A.; MENDELSON, M.; EDMONDSON, J.; AXEL, R. Visualizing an olfactory sensory map. **Cell**, Cambridge, v.87, n.4, p.675-686, 1996.

MONTI-BLOCH, L.; WHITE-JENNINGS, C.; DOLBERG, D. S.; BERLINER, D. L. The human vomeronasal system. **Psychoneuroendocrinology**, Oxford, v.19, n.5-7, p.673-686, 1994.

MUNGALL, A. J.; PALMER, S. A.; SIMS, S. K.; EDWARDS, C. A.; ASHURST, J. L.; WILMING, L.; JONES, M. C.; HORTON, R.; HUNT, S. E.; SCOTT, C. E.; GILBERT, J. G. R.; CLAMP, M. E.; BETHEL, G.; MILNE, S.; AINSCOUGH, R.; ALMEIDA, J. P.; AMBROSE, K. D.; ANDREWS, T. D.; ASHWELL, R. I. S.; BABBAGE, A. K.; BAGGULEY, C. L.; BAILEY, J.; BANERJEE, R.; BARKER, D. J.; BARLOW, K. F.; BATES, K.; BEARE, D. M.; BEASLEY, H.; BEASLEY, O.; BIRD, C. P.; BLAKEY, S.; BRAY-ALLEN, S.; BROOK, J.; BROWN, A. J.; BROWN, J. Y.; BURFORD, D. C.; BURRILL, W.; BURTON, J.; CARDER, C.; CARTER, N. P.; CHAPMAN, J. C.; CLARK, S. Y.; CLARK, G.; CLEE, C. M.; CLEGG, S.; COBLEY, V.; COLLIER, R. E.; COLLINS, J. E.; COLMAN, L. K.;

CORBY, N. R.; COVILLE, G. J.; CULLEY, K. M.; DHAMI, P.; DAVIES, J.; DUNN, M.; EARTHROWL, M. E.; ELLINGTON, A. E.; EVANS, K. A.; FAULKNER, L.; FRANCIS, M. D.; FRANKISH, A.; FRANKLAND, J.; FRENCH, L.; GARNER, P.; GARNETT, J.; GHORI, M. J. R.; GILBY, L. M.; GILLSON, C. J.; GLITHERO, R. J.; GRAFHAM, D. V.; GRANT, M.; GRIBBLE, S.; GRIFFITHS, C.; GRIFFITHS, M.; HALL, R.; HALLS, K. S.; HAMMOND, S.; HARLEY, J. L.; HART, E. A.; HEATH, P. D.; HEATHCOTT, R.; HOLMES, S. J.; HOWDEN, P. J.; HOWE, K. L.; HOWELL, G. R.; HUCKLE, E.; HUMPHRAY, S. J.; HUMPHRIES, M. D.; HUNT, A. R.; JOHNSON, C. M.; JOY, A. A.; KAY, M.; KEENAN, S. J.; KIMBERLEY, A. M.; KING, A.; LAIRD, G. K.; LANGFORD, C.; LAWLOR, S.; LEONGAMORNLEET, D. A.; LEVERSHA, M.; LLOYD, C. R.; LLOYD, D. M.; LOVELAND, J. E.; LOVELL, J.; MARTIN, S.; MASHREGHI-MOHAMMADI, M.; MASLEN, G. L.; MATTHEWS, L.; MCCANN, O. T.; MCLAREN, S. J.; MCLAY, K.; MCMURRAY, A.; MOORE, M. J. F.; MULLIKIN, J. C.; NIBLETT, D.; NICKERSON, T.; NOVIK, K. L.; OLIVER, K.; OVERTON-LARTY, E. K.; PARKER, A.; PATEL, R.; PEARCE, A. V.; PECK, A. I.; PHILLIMORE, B.; PHILLIPS, S.; PLUMB, R. W.; PORTER, K. M.; RAMSEY, Y.; RANBY, S. A.; RICE, C. M.; ROSS, M. T.; SEARLE, S. M.; SEHRA, H. K.; SHERIDAN, E.; SKUCE, C. D.; SMITH, S.; SMITH, M.; SPRAGGON, L.; SQUARES, S. L.; STEWARD, C. A.; SYCAMORE, N.; TAMLYN-HALL, G.; TESTER, J.; THEAKER, A. J.; THOMAS, D. W.; THORPE, A.; TRACEY, A.; TROMANS, A.; TUBBY, B.; WALL, M.; WALLIS, J. M.; WEST, A. P.; WHITE, S. S.; WHITEHEAD, S. L.; WHITTAKER, H.; WILD, A.; WILLEY, D. J.; WILMER, T. E.; WOOD, J. M.; WRAY, P. W.; WYATT, J. C.; YOUNG, L.; YOUNGER, R. M.; BENTLEY, D. R.; COULSON, A.; DURBIN, R.; HUBBARD, T.; SULSTON, J. E.; DUNHAM, I.; ROGERS, J.; BECK, S. The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. **Nature**, London, v.425, n.6960, p.805-811, 2003.

NINOMIYA, K.; BROW, R. E. Removal of preputial glands alters the individual-odours of male MHC-congenic mice and the preferences of females for these odours. **Physiol. Behavior**, v.58, n.1, p.191-194, 1995.

OBER, C.; WEITKAMP, L. R.; COX, N.; DYTCH, H.; KOSTYU, D.; ELIAS, S. HLA and mate choice in humans. **The American Journal of Human Genetics**, Chicago, v.61, n.3, p.497-504, 1997.

PEARSE-PRATT, R.; SCHELLINCK, H. M.; BROW, R. E.; ROSER, B. **Evolutionary and Immunological implications of the role of the MHC in olfactory signaling**. Em DOTY, R. L.; MÜLLER-SCHWARZE, D. Chemical Signals in vertebrates, p.167-175, New York: Plenum, 1992.

PENN, D.; POTTS, W. How do Major Histocompatibility Complex Genes Influence Odor and Mating Preferences? **Advances in Immunology**, New York, v.69, p.411-434, 1998.

PENN, D.; POTTS, W. The evolution of Mating Preferences and Major Histocompatibility Complex Genes. **The American Naturalist**, Chicago, v.153, n.2, p.145-164, 1999.

PORTER, R. H.; LEVY, F.; POINDRON, P.; LITTERIO, M.; SCHAAL, B.; BEYER, C. Individual olfactory signatures as major determinants of early maternal discrimination in sheep. **Developmental Psychobiology**, New York, v.24, n.3, p.151-158, 1991.

RESSLER, K.J.; SULLIVAN, S.L.; BUCK, L.B. Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. **Cell**, Cambridge, v.79, n.7, p.1245-1255, 1994.

ROSER, B.; BROW, R.; SINGH, P. **Excretion of transplantation antigens as signals of genetic individuality**. Em WYSOCKI, C. J.; KARE, M.R. *Chemical Senses*, p.187-209. New York: Dekker, 1991.

ROUQUIER, S.; TAVIAUX, S.; TRASK, B. J.; BRAND-ARPON, V.; van der ENGH, G.; DEMAILLE, J.; GIORGI, D. Distribution of olfactory receptor genes in the human genome. **Nature Genetics**, New York, v.18, p.243-250, 1998.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 3.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS, P. S. C.; SCHINEMANN, J. A.; GABARDO, J.; BICALHO, M. G. New evidence that the MHC influences odor perception in humans: a study with 58 Southern Brazilian students. **Hormones and Behavior**, New York, v.47, n.4, p.384-388, 2005.

SCHELLINK, H. M.; ROONEY, E.; BROW, R. Odors of individuality of germfree mice are not discriminated by rats in a abitation-disabitation procedury. **Phisiol. Behaviour**, v.57, n.5, p.1005-1008, 1995.

SHIINA, T.; INOKO, H.; KULSKI, J. K.; An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v.64, p.631-649, 2004.

SINGER, A. G.; BEAUCHAMP, G. K.; YAMAZAKI, K. Volatile signals of the major histocompatibility complex in male mouse urine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p.2210-2214, 1997.

SINGER, A.G.; TSUCHIYA, H.; WELLINGTON, J. L.; BEAUCHAMP, G. K.; YAMAZAKI, K. Chemistry of odortypes in mice: fractionation and bioassay. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.19, n.3, 1993.

SINGH, P. B.; BROW, R. E.; ROSER, B. MHC antigens in urine as olfactory recognition cues. **Nature**, London, v.327, p.161-164, 1987.

SPIELMAN, A. I.; ZENG, X. N.; LEYDEN, J. J.; PRETI, G. Proteinaceous precursors of human axillary odor – isolation of 2 novel odor-binding proteins. **Experientia**, New York, v.51, n.1, p.40-47, 1995.

SPRING, B.; FONATSCH, C.; MÜLLER, C.; PAWELEC, G.; KÖMPF, J.; WERNET, P.; ZIEGLER, A. Refinement of HLA gene mapping with induced B-cell line mutants. **Immunogenetics**, v.21, n., p.277-291, 1985.

THE MHC SEQUENCING CONSORTIUM. Complete structure and gene map of a human major histocompatibility complex (MHC). **Nature**, London, v.401, p.921-923, 1999.

VASSAR, R.; CHAO, S.; SITCHERAN, R.; NUNEZ, J.; VOSSHALL, L.; AXEL, R. Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. **Cell**, Cambridge, v.79, n.6, p.981–991, 1994.

VOLZ, A.; EHLERS, A.; YOUNGER, R.; FORBES, S.; TROWSDALE, J.; SCHNORR, D.; BECK, S.; ZIEGLER, A. Complex transcription and splicing of odorant receptor genes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.278, n.22, p.19691-19701, 2003.

WANG, J. W.; WONG, A. M.; FLORES, J.; VOSSHALL, L. B.; AXEL, R. Two-photon calcium imaging reveals an odor-evoked map of activity in the fly brain. **Cell**, Cambridge, v.112, n.2, p.271-282, 2003.

WEDEKIND, C.; SEEBECK, T.; BETTENS, F.; PAEPKE, A. J. MHC-dependent mate preferences in humans. **Proceedings Biological sciences**, London, v.260, n.1359, p.245-249, 1995.

WILSON, E. O. **Sociobiología: la nueva síntesis**. 1.ed. Barcelona: Omega, 1985. Trad. de Ramón Navarro.

YAMAZAKI, I. K.; BEUCHAMP, G. K.; IMAI, Y.; BARD, J.; PHELAN, S. P.; THOMAS, L.; BOYSE, E. A. Odortypes determined by the major histocompatibility complex in the germ-free mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, New York, v.87, n.21, p.8413-8416, 1990.

YAMAZAKI, I. K.; BOYSE, E. A.; MIKE, V., THALER, H. T.; MATHIESON, B. J.; ABBOTT, J.; BOYSE, J.; ZAYAS, Z. A.; THOMAS, L. Control of mating preferences in mice by genes in the major histocompatibility complex. **The Journal of experimental medicine**, New York, v.144, n.5, p.1324-1335, 1976.

YOUNGER, R. M.; AMADOU, C.; BETHEL, G.; EHLERS, A.; LINDAHL, K. F.; FORBES, S.; HORTON, R.; MILNE, S.; MUNGALL, A. J.; TROWSDALE, J.; VOLZ, A.; ZIEGLER, A.; BECK, S. Characterization of clustered MHC-linked olfactory receptor genes in human and mouse. **Genome Research**, New York, v.11, n.4, p.519-530, 2001.

ZIEGLER, A. Biology of chromosome 6. **DNA sequence**, London, v.8, n.3, p189-201, 1997.

ZIEGLER, A.; DOHR, G.; UCHANSKA-ZIEGLER, B. Possible roles for products of polymorphic MHC and linked olfactory receptor genes during selection processes in reproduction. **American Journal of Reproductive Immunology**, Denmark, v.48, n.1, p.34-42, 2002.